

2013/8033A

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 25 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 加藤 誠 也

平成 26(2014)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…………… 25
2. 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用……………岡田 全司…………… 34
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…………… 52
4. 小児結核全般の実態調査……………徳永 修…………… 57
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…………… 87
6. 集団感染事例で分離された結核菌の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較
前田 伸司…………… 93
7. 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
岩本 朋忠…………… 99
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…………… 105
9. 結核菌の病原性と微細形態学的特徴との関連に関する研究……………山田 博之…………… 111
10. 日本版 DOTS の強化・向上……………小林 典子…………… 128
11. 慢性排菌患者に対する治療の研究、IGRA の予測価値の検討と
偽陰性要因の遺伝的解析……………吉山 崇…………… 140
12. 施設内感染対策に関する研究
結核感染・罹患時の基礎疾患への影響について……………加藤 誠也…………… 143

| | | |
|------|---------------------|-----|
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表..... | 155 |
| IV. | 研究成果の刊行物・別刷..... | 161 |

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

本研究班は画期的な診断・治療法及び革新的な対策の開発に寄与することを目的として、新抗結核薬を用いた治療法の検討、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て、感染性・病原性の評価・解明、宿主の新規遺伝子・IGRA に関する発病に関する要因の評価・解明を行うとともに、現行の対策の強化を目的とする、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から構成されている。

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

臨床現場における新抗結核薬の使用に関する質問票調査によって、リファブチンは多剤耐性結核 (MDR TB) 患者の 53.8%, リネゾリドは 91.7% に有効であった。デラマニドは MDR TB の治療効果が報告され、AIDS モデルマウスで結核治療効果があった。カプラザマイシンは超薬剤耐性結核 (XDR TB) のマウスで治療効果があり、INH + RFP 治療法と相乗効果があった。MDR TB 患者や難治性 (糖尿病合併等) 結核患者では CD8 陽性 T 細胞からの結核菌殺傷タンパク *granulysin* 産生低下が著明であった。*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。

(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

医療従事者でインターフェロン γ 遊離試験で潜在性結核感染 (LTBI) あり群・なし群、それぞれの全血由来の total RNA を得て、特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA 発現量をリアルタイム RT/PCR 法で定量し、相関解析を行なった。その結果、LTBI 群では miR-223 と IFN γ 遺伝子 (*IFNG*) mRNA, miR-421 とインターロイキン 2 遺伝子 (*IL2*) mRNA の相対発現量がそれぞれ負の相関を示していた。これらの miRNA が LTBI における宿主免疫応答を修飾している可能性が考えられた。活動性結核患者ではこのような相関は見られず、LTBI 群でみられる生体内での軽微なサイトカイン応答をこれら miRNA が制御している可能性が考えられた。

(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

結核患者の入院期間の短縮化を目的に、Propidium monoazide (PMA) が死菌の PCR 反応を抑制する性質を利用し、結核菌の生死を迅速に判定する方法を検討した。PMA の結核菌における至適濃度 100 μ M にて対数増殖期の結核菌について、Auramine O-CTC 染色法による呼吸活性評価との比較を行った結果、PMA-PCR 定量系と Auramine O-CTC

染色法による定量は、生菌・死菌の比率判定において一致していた。結核菌濃度 ($10^3 \sim 10^8$ cfu/mL) に関係なく PMA が作用すると考えられたが、一方で死菌での核酸増幅抑制効果が一定しない現象が観察されており、実験系の安定性を得るための改善が必要と考えられた。治療前の結核患者から採取した喀痰検体で PMA-PCR 定量系を評価し、一定濃度以上の検体であれば喀痰でも PMA-PCR 定量系が応用可能であることが示された。

(4) 集団感染事例で分離された結核菌の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較

集団感染事例で分離された株を用いて遺伝系統及び型別分析を行った。菌株の Large sequence polymorphisms (LSP) 及び遺伝系統を調べると、RD181 及び RD150 陰性の北京型-modern 株だった。VNTR 分析では、hyper-variable の 1 ローカス (VNTR-3232) のみコピー数が異なっていた。全ゲノム解析では、関連した結核菌の遺伝的進化方向と疫学調査結果に齟齬が生じていることが明らかとなり、SNP 存在の有無だけでヒトからヒトへの感染の方向を判断するのは難しいと考えられる結果となった。

(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

本邦の多剤耐性結核菌は諸外国に比して高率に *rpoC* 遺伝子変異を有し、感染拡大能力の高い株が多く存在することが示唆された。*rpoC* 変異は *rpoB* コドン 531 変異株でほぼ独占的に検出され、両遺伝子間の強い相互作用を示唆された。再排菌事例株で、*rpoC* 遺伝子変異を新規に獲得した株が検出された。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

全国広域的かつ持続的に分離される VNTR 型別一致株及び疫学的リンクを持たない VNTR 型別一致株に着目し、菌株の異同性、関連性を分析することを目的とした。ゲノム比較に基づいて M 株 (10 株) の共通変異を調べ、同株の新しい定義とすることによって VNTR 型別の偶発的変異に左右されない検出方法とした。これによってサーベイランス株 2,410 株のうち 52 株が M 株として同定され、株固有のゲノムバリエーションを活用した系統分類によって全国的な拡散と地域的な拡散を区別して調査しうる可能性が示唆された。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

透過型電子顕微鏡 (TEM) による急速凍結法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察 (serial ultra-thin section, SUS) により、1 菌体ごとの全体像を高分解能で可視化し、菌体構成成分の実測による定量を行った。菌体直径はほぼ近似していたが菌体長には多様性があった。生きた状態に近い形態が観察出来る氷包埋サンプルを Cryo-TEM で観察し、菌種ごとの標準形態を計測した

(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

慢性排菌患者に対する医療として新薬 2 剤目の検討が必要であり、先進医療もしくはその他の方法が必要と考えられた。第三世代クオンティフェロン検査結果を把握している保健所の症例ごとにアンケート調査でその後の発病状況を検討し、発病予測に有用との情報を得た。フロロスポットを用いた免疫学的検討により治療終了結核患者群ではメモリー T 細胞が多いことを示唆していると考えられた。

(9) 小児結核全般の実態調査

BCG 接種後のコッホ現象例の推移及び対応の課題検討を明らかにするために、2012 年 1～12 月に厚生労働省結核感染症課に報告された事例報告書全例を分析した。2005 年～09 年の報告例の集計とほぼ同様の例数であり、また出生人口 10 万対の例数も同様であった。疑い例における感染・発病診断検査データの集積、精査対象例の発病に関する前向き追跡、より鋭敏な感染診断法導入に向けた検討が必要と考えられた。2 種類の IGRA の診断特性の検討を行った。QFT は第 2 世代から第 3 世代になって、「判定不可」例が有意に減少し、TSPOT との判定の乖離は非常に少なかった。発病例での感度は第 2 世代同様良好と考えられた。しかしながら、乳児未発病感染例（≒LTBI 例）における感度不良が示唆された。これらより、IGRA を積極的に適用することは発病例の見逃しを減らすために有用と考えられた。

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、発病に至った小児結核症例の課題を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。「コッホ現象」、「薬剤耐性結核」、「結核性髄膜炎」、「脆弱な家庭機能の支援」、「服薬支援」、「外国籍」、「診断の遅れ」、「患者発病後の疫学調査」、「小児結核医療体制」、「学校との連携」などの課題が抽出可能であった。

(10) DOTS の強化・向上に関する研究

新登録患者（潜在性結核感染症治療を含む）581 人について服薬支援活動における活用状況を集計・分析した。結核患者のリスク評価項目に対する介入の有無およびその内容について調査した結果、治療開始時のリスクへの介入が行われ、そのうち 7 割がリスク改善に至っていることが明らかになった。『結核看護システム』での治療開始後 6 ヶ月ないし 9 ヶ月の自動的判定後の治療継続状況について観察を行なった結果、WHO 方式のアルゴリズムによる判定とあまり大きく異ならないことが知られた。

(11) 薬剤耐性の実態調査

第 15 回となる耐性結核菌全国調査の実施を企画した。統計的に必要な患者数を未治療患者 7,339 例、既治療患者 952 例と設定した。過去三年以内の外部精度評価に合格を研究への参加条件とし、それぞれの施設における薬剤感受性検査データを用いることとした。患者情報は結核患者情報システムから保健所の協力を得て収集することとした。

(12) 院内感染対策に関する研究

昨年度作成した「結核院内（施設内）感染予防の手引き」の(案)を関係団体と協議・修正し完成版を作成した。今後、院内感染対策に活用されることが期待される。

(13) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響

免疫抑制状態の患者が結核感染または発病した場合の対応を明らかにするために、移植、透析、がん治療の専門家に質問票調査を行った。免疫抑制を有する領域の医師は結核対策への関心を有しているが、具体的な運用について未だ定着していないことがうかがえた。

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 臨床研究センター長）

慶長直人（公益財団法人結核予防会結核研究所生体防御部 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部主任研究員）

吉山 崇（公益財団法人複十字病院呼吸器内科 診療主幹）

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

佐々木結花（公益財団法人複十字病院呼吸器内科 診療主幹）

A. 研究目的

本研究班は革新的な診断・治療法及び対策の開発に寄与することを目的として、新抗結核薬を用いた治療法の検討、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て、感染性・病原性の評価・解明、宿主の新規遺伝子・IGRAに関する発病に関する要因の評価・解明を行うとともに、現行の対策の強化を目的とする、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から構成されている。

分担研究の個々の目的は以下のとおりである。

(1) 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

近年開発の動きが活発化している新抗結核薬及び既存薬で抗結核菌作用を有すると

考えられている薬剤を使って、治療が困難な慢性排菌患者の治療、標準化学療法の治療期間短縮及び治癒率向上、HIV合併例等への適用の検討を目的とする。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、潜在性結核感染症における全血中の *miRNA* と免疫関連遺伝子の発現解析による宿主の結核免疫応答の検討を通じ、宿主応答の個体差に関する適切な新規指標(バイオマーカー)を見出し、結核発病高危険群の同定を含め、結核免疫病態の解明に貢献す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、結核菌の生死を培養以外の方法で迅速に判定する方法を開発することを目的とする。本年度は生菌の遺伝子増幅を抑制する原因の解明と、菌量による PMA の効果の違い、また臨床検体（喀痰）での本実験系利用の可否を検討した。

(4) 集団感染事例で分離された結核菌の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較

集団感染事例で感染力が高いと考えられる株を対象に、接触者調査で判明した疫学情報と次世代シーケンサー（NGS）から得られた遺伝型を比較し、感染経路の推定に NGS の利用の可能性を明らかにする。

(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

多剤耐性結核菌において、薬剤耐性関連遺伝子の変異により低下した生存能力を回復させる補填的変異の保有状況の解明を目指した。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

「全国的に持続的に分離される VNTR 型別一致株」及び「疫学的リンクを持たない VNTR 型別一致株」各々の菌株を選択してゲノム比較を行い、異同性を調べることで、「真の伝播経路」を把握することを目的とした。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

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により、菌体の全体像を細胞壁外膜、菌体内部構造を含めて高分解能で可視化し、菌体構成要素の局在、表面積、体積、リボソーム数の計数を行い、分子生物学的データとの連携により結核菌の病原性発現の解明を目指す。また、結核菌のコロニーの特徴であるコード形成を走査型電子顕微鏡で観察し、非結核性抗酸菌と比較して、病原性との関連を検討する。

(8) 慢性排菌患者に対する治療の研究、IGRA の予測価値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

本研究の目的は、1) 慢性排菌患者に対する医療体制を提案すること、2) 接触者健診におけるクオンティフェロン第三世代 (QFT-3G の) の判定結果ごとの発病率を計算すること、3) 休眠期の結核感染診断法を開発すること、である。

(9) 小児結核全般の実態調査：

1) 平成 24 年度コッホ現象事例報告書を対象とした解析

本研究の目的は、①BCG 接種後のコッホ現象例の推移を明らかにすること、②コッホ現象が疑い例への対応上の課題を明らかにすること、③2013 年 4 月以降の BCG 接種時期変更に伴う感染・発病への影響を明らかにするための基礎データとすること、である。

2) 小児を対象とした結核感染診断における QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

本研究の目的は QFT 第 3 世代及び T-SPOT TB の小児を対象とした結核感染診断におけるパフォーマンスに関する検討することである。

3) 首都圏及び近畿小児結核症例検討会

小児結核に関する関心を喚起し、正確な知識を普及すること、また、発病に至った小児結核症例が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とした。

(10) DOTS の強化・向上に関する研究

「結核患者に対する DOTS の推進」の一部改正（平成 23 年 10 月）において、全患者が DOTS の対象となり、同時に院内 DOTS が DOTS チームケアによる患者中心の包括的支援と明確化され、さらにリスクと支援頻度を関連づけた患者中心の地域 DOTS の推進が明記された。本研究は、この通知を受けて、DOTS および患者支援体制全般の強化を目指すことを目的とした。

(11) 薬剤耐性の実態調査

前回の 2007 年の耐性結核菌全国調査から 5 年以上が経過した。この調査で課題となった三種病原体の輸送、一部施設への過剰な負担等の問題を回避し、感受性試験精度保証と疫学的地域バランスに配慮した研究デザインによって、第 15 回調査の実施を企画することを目的とした。

(12) 院内感染対策に関する研究

院内集団感染事例の報告数 23 年に増加したことを受けて、「結核院内（施設内）感染予防の手引き」を策定するとなった。本年度は昨年度策定した原案に関する関係団

体等の意見を取り入れ、最終版を作成することを目的とした。

(13) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響に関する研究

免疫抑制状態にある患者が結核を発病した場合、あるいは潜在性結核感染症であった場合、それぞれの専門医が結核感染や発病時の基礎疾患治療の継続、あるいは発症の予防をどのように考えているかに関して、現状を把握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) 新抗結核薬の使用状況調査

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メロペネムクラブラン酸 ④リファペンチン ⑤モキシフロキサシン

（MFLX）の臨床における実態調査を行った。調査項目は、①性別、②年齢、③結核診断名、④薬剤耐性、⑤基礎疾患（合併症）、⑥治療内容、⑦投与量・投与期間、⑧効果、⑨副作用、⑩（入院の場合退院・転帰）、⑪転帰、⑫診療上の問題と対応、であった。

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した。

3) 慢性排菌や再発の予後診断

結核患者と健常人の血清中及びリンパ球を結核抗原で刺激した培養上清の granulyisin, Ksp37 を測定し、結核重症度、難治性の関連を解析した。

(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

インターフェロン γ (IFN γ)遊離試験で LTBIありと判断された医療従事者 41 名、LTBIなしと判断された 68 名について、total RNA を抽出した。

miRNA の定量的 RT-PCR 解析は、polyA 付加反応と逆転写反応を同時に行った上でリアルタイム PCR を行った。全血より抽出した total RNA を SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) と random nonamer で逆転写し、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遺伝子群の mRNA 発現量を測定した。各 miRNA 相対発現量と細胞性免疫関連遺伝子群 (28 遺伝子) の mRNA 相対発現量を求め、Spearman の順位相関係数を算出した。

(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

M. tuberculosis H37Rv を Middlebrook 7H9 培地を用いて培養し、3 日目、5 日目、7 日目および 21 日目に、1) PMA を用いた TaqMan MTB による生菌数の定量、2) Auramine O-CTC 二重染色による生菌数の割合の算出、及び 3) 7H10 培地における生菌数の計数 (cfu) を行った。それぞれのポイントは以下のとおりである。

1) PMA を用いた PCR 系による生菌数の定量:PMA の終濃度は 200 μ M, 照射は 600W のハロゲンランプを 20 cm の距離から 1 分間とした。

2) Auramine O-CTC 二重染色:再懸濁した菌液に CTC 溶液および Enhancing reagent B を添加し、インキュベート後スライドグラスに滴下し、自然乾燥させた。

ホルンリン固定後に Auramine O 染を行った後、LED 蛍光顕微鏡を用いて 450 nm の励起光下で CTC 染色の赤色および AO 染色の緑色の細菌を観察、写真撮影を行った。
3) 7H10 培地における生菌数の計数:段階希釈した菌液を当該培地に接種し、3 週間後にコロニー数を算出した。また、10 倍毎に 6 段階の菌濃度の異なる菌液を用いて PMA の効果を検討した。

臨床検体の検討には 3 人の結核患者の治療開始前の喀痰を用いた。

(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

家族及び職場が関与した集団感染事例で、初発患者の菌も含めて分離できた 4 株を解析に用いた。スポリゴタイピング及び Large sequence poly- morphisms (LSP) については、RD181 及び RD150 の欠損の有無、NTF 領域への IS61110 の挿入の有無の同定を実施した。VNTR 分析は 36 loci のコピー数を調べた。全ゲノム解析には HiSeq2000 (イルミナ社)を用いた。SNP 部位として多型性の高い PE/PPE 遺伝子や Mycobacterium cell entry protein (*mce*) 遺伝子ファミリーのオープンリーディングフレーム (ORF) 中の変異は除いた。さらに、これらの株と同じ北京型 modern 系統の結核菌が、共通に持つ SNP 部位も除き解析を行った。

(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

1) 神戸市結核菌バンク事業により収集した多剤耐性結核菌 36 株と大阪府で分

- 離された多剤耐性結核菌 16 株の計 52 株を用いた。また、感染拡大株検出の目的で、近畿中央胸部疾患センターにて 2001-2008 年に分離された多剤耐性結核菌 98 株の遺伝型別解析を行った。
- 2) *rpoB* のホットスポット領域 81bp (RRDR) の塩基配列を解析した。生存能力の補填的変異として、*RpoA-RpoC interaction area* を含むアミノ酸ポジション 240-822 の塩基配列 (1749nt) を解読した。
 - 3) 多剤耐性結核菌 98 株の 15-MIRU-VNTR 解析及び IS6110-RFLP による二次解析により、10 株からなるクラスターを形成する感染拡大株 2 株を特定し、解析に用いた。
 - 4) 既知の補填的変異が検出されなかった感染拡大株 1 株について Hiseq (イルミナ社) を用いて、全ゲノム解析を行った。
- (6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析
- 1) 広域拡散性クラスター株 (M株) の比較ゲノム解析
5 地域 (山形、東京、大阪、神戸、沖縄) における結核分子疫学サーベイランスでの 7 株及び接触者調査から 2 株、多剤耐性株の 1 株を加え、計 10 株を比較ゲノム対象とした。さらに、先行研究によって近縁株であることが判明していた株 (T85) の NGS 配列情報をデータベースから得て、その変異箇所を M株の共通変異から差分することにより、M株共通の固有変異を決定した。
 - 2) M株の再定義：
10 株に共通の変異 (92 か所) は、M株を他の株と区別するための遺伝マーカーとして活用した。M株と同じ系統群 (新興型北京ファミリー) に属する菌株を 490 株 (20.3%) 抽出し、共通変異 (92 か所) のうち 1 か所 (1757565 G->A) を選び、リアルタイム PCR で検出できるように設計された MGB プローブを用いてアレル解析を行った。
 - 3) M株のクローン内系統分類：
ゲノム比較した 10 株の中でバリエーションが認められる変異 (58 か所) をマーカーに、M株共通の変異を持つ 52 株について変異の有無を確かめ、その結果に基づいて、maximum pulmonary tree を構築し、系統分類した。
 - 4) 病原体サーベイランスにおける VNTR 型別一致株のゲノム比較
山形県の結核分子疫学サーベイランスにおける対象 184 人から分離された結核菌株において、24 領域 VNTR のうち 23 領域が一致した菌株 (49 株) のゲノム DNA を抽出した。
- (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 週間培養後、標本を作成し、JEOL JEM1230 透過電子顕微鏡で観察した。グリッド 12 枚、計 500 枚以上の超薄連続切片を作製し、観察に適した菌体を選び、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、自然科学研究機構生理学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター内の FEI Vitrobot にて急速凍結、氷包埋し、Cryo-TEM (JEM-2200FS) で観察した。

(8) 慢性排菌患者に対する治療の研究、IGRA の予測価値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

1) 昨年報告したベダキリンの後の薬剤について、新たな学会情報をもとに検討した。

2) 保健所にアンケート調査を行い、2010 年に各保健所で接触者健診時の QFT-3G の判定結果毎に、経過追跡結果を得て発病率を計算した。

3) 新規結核患者、結核治療終了者、潜在性結核感染者、および健常者の 4 群、それぞれ 50 名の結核菌特異抗原、および休眠期特異的抗原を用いた ELISPOT 法、FluoroSpot 法によって、サイトカイン産生パターンを解析した。結核菌抗原として ESAT-6・CFP-10、休眠期抗原 Rv2660c および MDP1 を用いた

(9) 小児結核全般の実態調査

1) 平成 24 年度コッホ現象事例報告書を対象とした解析

平成 24 年 1 月～12 月の BCG 接種後に市町村・都道府県を通じて厚生労働省結核感染症課に報告されたコッホ現象事例報告書全例を分析した。

2) 小児を対象とした結核感染診断における QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

2010 年 3 月以降 2013 年 12 月までに国立

病院機構南京都病院において、2 種の IGRA を同時に適用した小児例を対象にその症例背景及び判定結果について後方視的な検討を行った。

3) 首都圏及び近畿小児結核症例検討会

近畿地区及び首都圏において、診断や治療、治療支援、症例発見後の事後対応などに課題を有した小児結核症例を抽出し、診療に当たった臨床医及び接触者健診・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とその問題点を呈示し、参加者と共に討議を行った。

(10) DOTS の強化・向上に関する研究

患者指導ツールソフトウェア『結核看護システム (以下、本システム) を用いた 10 自治体 19 保健所で以下の検討を実施した。

1) 治療継続、連携に関する分析

DOTS 実施率の算出、看護の視点からリスク、合併症、服薬支援計画、DOTS パートナーの項目について分析した。

2) 患者のリスク項目に関する調査

リスク項目 (25 項目) の確認の有無、支援方法の検討の有無、介入の結果リスクが軽減されたか、具体的な支援や介入の方法について調査した。

3) 自動アルゴリズムの検討

本システム上「治療成功」と「脱落」・「中断」と判定された患者に関して、治療期間が延長された場合の成績の違いを検討した。

4) 結核患者の喫煙習慣

11 都道府県、28 保健所に登録され、新たに結核の治療を開始した 1366 人の新登録患者について治療開始時、治療終了時の喫煙習慣を調べ、これを 2010 年 (平成 22 年) の一般住民の標本調査成績と比較した。

5) DOTS ガイドラインの検討

結核病床を有する医療機関 298 病院を対象にした外来での DOTS 実施アンケート調査から、ガイドラインの留意点を抽出した。さらに、結核予防会第一健康相談所で行っている外来患者を対象とした DOTS カンファレンスの実施状況を踏まえ、外来 DOTS ガイドラインの基本指針の基礎資料を検討した。

(11) 薬剤耐性の実態調査

日本における耐性結核菌の総合的な情報を全国レベルで収集・解析することを目標に、2007 年の全国調査の RFP 耐性を元に必要検体数を算出した。また、薬剤感受性検査の精度保障を確保したうえで、個人情報を含まない患者情報を調査参加施設の負担が最少になるよう方法を検討した。

(12) 院内感染対策に関する研究

平成 12 年版の「結核院内（施設内）感染予防の手引き」を元に作成した原案に対して厚生労働省結核感染症を通して関係団体の意見を聴取して、内容を修正した。

(13) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響に関する研究

日本移植学会認定移植可能施設責任者、日本リウマチ学会教育認定施設責任者、日本癌治療認定機構認定研修施設責任者を対象にアンケートを送付し、回収した。

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) 新抗結核薬の使用状況調査

調査票を送付した 259 施設中 129 施設

(49.8%) より回答が得られた。結核治療剤使用症例は、①リファブチン 39 症例、②リネゾリド 27 症例、③メロペネム-クラブラン酸 2 症例、④リファペンチン 0 例、⑤モキシフロキサシン 16 例、合計 84 症例であった。

リファブチン 39 症例のうち、有効例は 33 例 (89.6%) で、無効例 5 例 (17.7%) であった。MDR-TB13 症例に対する効果は有効 7 例 (53.8%)、無効 5 例 (38.5%) であった。

リネゾリド (27 症例) の効果は有効 (24 例) と 88.9% で効果が認められ、MDR-TB24 例に対して 91.7% 有効であった。

メロペネム-クラブラン酸では 2 例中 2 例 (100%)、モキシフロキサシンでは 16 例中 11 例 (68.8%) に有効であった。

副作用は、リファブチンは 39 例中、16 例 (複数回答) の報告があり、白血球減少 4 例、血小板減少・汎血球減少症 1 例、肝機能異常 4 例、貧血 3 例、その他 4 例の報告があった。リネゾリドは 27 例中、8 例 (複数回答) で骨髄抑制 2 例、ショック 1 例、その他 5 例が報告された。メロペネム-クラブラン酸やモキシフロキサシンは症例数が少ない影響かもしれないが、少数であった。

2) 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、超多剤耐性結核に治療効果、INH+RFP 治

療法と相乗的結核治療効果, 新規結核治療ワクチン (HSP65+ IL-12DNA)併用治療にて相乗効果が認められた。

3) granulysin や Ksp37 を用いた慢性排菌や再発の予後診断

- ・ MDR-TB では薬剤感受性結核患者に比較してキラーT リンパ球中の granulysin が有意に低下していた。
- ・ MDR-TB 患者はの健常人に比較して, PPD や結核死菌抗原刺激で 40 時間培養上清中の granulysin 産生低下が認められた。
- ・ 結核患者では健常人に比較して血清中の granulysin 低下するが, 結核剤治療で血清 granulysin 正常化。
- ・ granulysin は結核菌を直接殺傷する機能のみでなく、キラーT 前駆細胞からエフェクターキラーT 細胞へ分化させる強力なキラーT 分化因子活性を有する。
- ・ KSP37 はキラーT 細胞分化誘導作用、IL-2、IFN- γ 、IL-6 産生誘導。granulysin と KSP37 はキラーT 細胞分化相乗効果。
- ・ キラーT 細胞から産生される Ksp37 蛋白 (killer-specific secretory protein37kDa) が結核患者の血清中で有意に低下していることを発見した。
これを用いた新しい細胞免疫診断法の確立を行いつつある。

(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

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、順位相関係数を算出した結果、LTBI 群では、

miR-223 と IFN γ 遺伝子(*IFNG*) mRNA の発現量および miR-421 とインターロイキン2 遺伝子 (*IL2*) mRNA の発現量が、それぞれ負の相関を示していた。しかし、非 LTBI 群では関連がみられなかった。

(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

- ①対数増殖期にある結核菌の生菌の割合の検討では、PMA-PCR による定量生菌数は経時的に増加したが、その程度は real-time PCR による全菌数の増加に比べて軽度であった。そのため、生菌数の割合は 3 日目で 46.5%であったのに対し、21 日では 13.2%に低下した。
- ②Auramine O-CTC 二重染色による生菌・死菌数の定量的結果は、死菌/生菌の比率は PMA-PCR 定量的結果とほぼ同じであった。
- ③7H10 培地によるコロニー数の計数は、TaqMan PCR による生菌数の結果と比較すると、培養 3 日目における両者の生菌数はほぼ同等であったが、5 日目、7 日目と菌数が増加するにつれ、培養法における菌数の方が Taq Man PCR 法に比べて高値を示した。
- ④PMA の効果は菌濃度の違いに関係なく生菌の割合は 32~64%であった。同時に行った Auramine O-CTC による生菌の割合は 48%であった。しかし、2 回目の実験では菌量が少ないほど PMA による遺伝子増幅抑制作用が強かった。また、菌濃度が 10^5 cells/mL 以上の時、PMA による遺伝子増幅抑制効果はまったく見られず、全菌数よりも生菌数が多い計算となった。

3 人の患者の臨床検体を用いた結果、菌

数が少ない患者では PMA 添加時の定量値が非添加時より高値を示した。

(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) 解析した菌株の遺伝子型

解析した 4 株の遺伝型は全てが北京型 modern 型で、LSP 分析では国内で主流の RD181 領域を欠損であったが、RD150 領域も欠損しており、マイナーな系統の株であった。

2) VNTR による型別分析

4 株の VNTR 法での 36 ローサイは、1 株の hyper-variable の 1 箇所 (VNTR-3232) を除き全て 4 株間で一致した。

3) 全ゲノム解析

Index case と家族内感染菌株間で 5 箇所の共通する SNP を見出した。これら 5 箇所の SNP 部位は非同義置換 (アミノ酸変異が伴う) 変異なので、発現される酵素の代謝活性に影響を与えている可能性が高いと考えられる。

(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) 52 株の多剤耐性結核菌のうち、22 株 (42.3%) で *rpoC* 遺伝子のアミノ酸置換を伴う非同義置換が検出された。

2) 北京型株と非北京型株間には *rpoC* 遺伝子変異保有株の割合に違いは認められなかった (42% vs 44%)。一方、北京型株内の亜型間で比較すると、初期祖先型株 (ST26) と新興型株で高い変異保有率であった。

3) *RpoC* 遺伝子の変異は、*rpoB* のコドン

531 変異株にほぼ独占的に出現しており (95.5%, 21/22)、両遺伝子間の相互作用が強く示唆された。

4) 再発事例株の結果から、*rpoC* 遺伝子変異は *rpoB* 遺伝子変異出現後の二次変異として出現することが臨床分離株で確認された。

5) *rpoB* コドン 531 に変異を持つ、感染拡大株 (large cluster A) で *rpoC* 変異が確認された。一方、*rpoB* コドン 516 に変異を持つ感染拡大株 (large cluster B) では *rpoC* 変異は検出されず、未知の補填的変異の存在が示唆される。

(6) 結核菌臨床分離株ゲノム情報の集積と統合的解析

1) M 株の比較ゲノムとクローン性

共通祖先から各ゲノム解析株までに蓄積された置換変異数は最大 13 か所に留まり、これら 10 株のクローナルな関係が認められた。

疫学的リンクがある 2 株間の置換変異は 1 か所のみ、また、同一患者の耐性化事例では耐性関連遺伝子 (2 か所) にだけ変異が検出された。それ以外の株同士では 7 個以上、最も遠い株間 (KK2647 と FY21N052) では 23 か所の変異の置換変異が見いだされ、直近の伝播よりも遠い関係が支持された。分解能が高い 24 領域 VNTR で一致した菌株間でも、NGS 解析によってゲノム上に蓄積された菌株多様性を検出できることを示した。

2) M 株のサーベイランス調査

M 株に共通する変異を遺伝マーカーとしてサーベイランス株 (2,410 株) を調査

したところ、52株に同変異が認められ、すべてストレプトマイシン耐性であり、VNTR24領域が完全一致した株は35株(67.3%)にとどまった。

3) ゲノム抽出プロトコルの改良

サーベイランス解析クラスター形成株(49株)を用いて、菌体を小川培地から集菌後、メタノール・クロロホルムによる不活化・脱脂処理時に凍結し、非感染化させてから輸送することにより、以後の抽出操作(リゾチーム、プロテイナーゼ処理および核酸精製)を収率よく行えることを確認した。

(7) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連

5菌体の計測データは、平均菌体直径、細胞質直径はそれぞれ0.345 μm, 0.293 μmで菌体ごとの差はほとんど見られなかったが、その他の計測値は菌体ごとに差が見られた。菌体長に関しては、菌体1と菌体2が2 μm以下であるのに対して、他の3菌体は3 μmを超えていた。同じ連続切片内で縦断面を観察できた菌体で細胞分裂像を示すものがいくつか見られたが、3 μm以上の菌体長を示した3菌体の横断面で細胞分裂を示す像は認められなかった。菌体内リボソームに関しては、4菌体ではリボソーム数が850から約2,000計数されたが、1菌体(菌体2)ではわずか49であった。

②抗酸菌の氷包埋サンプルのCryo-TEM観察

結核菌H37Rv株について14菌体の形態計測を終了し、平均菌体長: 2.67 ± 0.83 (SD) μm、平均菌体幅: 0.55 ± 0.06 (SD) μmを得た。

(8) 慢性排菌患者に対する治療の研究、IGRAの予測価値の検討と偽陰性要因の遺伝的解析

1) 慢性排菌患者に対する新薬

期待される新薬の中で、デラマニドは承認申請中である。ベダキリンはcompassionate useの先進医療の対応が考えられる。これらによる国内研究は多剤耐性患者が100人に達しないことから、困難と考えられた。

2) 保健所の接触者健診でQFT-3G対象者の経過観察

QFT-3Gの結果が把握されていた者は1469例(陽性: 254例、判定保留: 158例、陰性: 1057例)であった。3カ月以内に発病していたのは陽性254例中12例、判定保留158例中1例、陰性1057例中1例であった。3カ月以降経過観察されていた者で、陽性であった者166例の中で、LTBI治療あり105例中4例、LTBI治療なし61例中6例が発病した。判定保留107例中1例、陰性348例中1名が発病していた。多くの陰性判定保留者は追跡されていなかった。LTBI治療中断例9例中1例(11%)の発病者が居たのに対して、6~9か月完了した者88例での発病者はなかった。

3) 休眠期の結核感染診断法

検討対象の4群の検体収集は終了し、今回この一部の検体を用いてサイトカイン産生応答性を検討した。治療終了結核患者群において、ESAT-6、CFP-10に対するIL-2産生応答が、活動性結核患者群よりも高い傾向が見られた。一方、Rv2660c、およびMDP1に対するサイトカイン産生応答、特にIFN-γ応答は十分なシグナルが得られ

なかった。

(9) 小児結核全般の実態調査

1) 平成 24 年度コッホ現象事例報告書を対象とした解析

報告された事例報告書は 147 例であった。このうち 43 例は報告書が提出された時点で結核未感染と判断されていた例であった。適切な時期に実施したツ反が「陽性」であった 40 例のうち、26 例では結核既感染例と判断され、発病に関する画像検査が適用され、1 例で発病治療が、25 例で LTBI 治療が開始されていた。また、ツ反が「陰性」であった 1 例についても接種局所所見の推移より既感染の可能性が強く疑われ、発病予防を目的とした治療が開始された。一方、ツ反が「陽性」であった 40 例のうち 9 例では LTBI 治療は適用されずに「経過観察」とされていた。

2) 小児を対象とした結核感染診断における QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

①QFT-G から QFT-GIT への変更に伴って乳幼児「判定不可」例が有意に減少した、②小児を対象とした QFT-GIT 及び T-SPOT の判定結果乖離例は年齢によらず非常に少数例であった、③発病例を対象としては QFT-G と同様に良好な感度を認めた、④ BCG 接種後局所所見推移やツ反結果より結核既感染と判断したコッホ現象例では、発病例を除いて IGRA 陽性例は認めず、乳児未発病感染例（≒LTBI 例）における感度不良が示唆された。

3) 首都圏及び近畿小児結核症例検討会

第 4 回首都圏小児結核症例検討会においては①コッホ現象を契機に発見された肺門

リンパ節結核 4 ヶ月児例、②母の肺結核発症後に診断に至った、治療経過中に初期悪化を認めた肺結核・結核性髄膜炎 4 ヶ月児例、③感染源症例の薬剤耐性が判明した兄弟発病・感染例が提示された。第 11 回近畿小児結核症例検討会においては①症状出現後、診断までに 5 ヶ月を要し、治療継続を目的とした家族支援、学習支援を行った外国籍中学生肺結核症例、②保健所による服薬支援及び感染源探索を目的とした疫学調査に協力を得られなかった中学生肺結核症例、③治療継続を目的に医療機関と保健所が連携を取りながら若年母子家庭の支援に取り組んだ幼児肺結核症例、④小児結核事例が非常に稀な地域で発生した 7 歳女兒肺結核事例が呈示された。今年度の呈示症例からは「コッホ現象」、「薬剤耐性結核」、「結核性髄膜炎」、「脆弱な家庭機能の支援」、「服薬支援」、「外国籍」、「診断の遅れ」、「患者発生後の疫学調査」、「小児結核医療体制」、「学校との連携」などの課題が抽出可能であった。

(10) DOTS の強化・向上に関する研究

1) 治療継続、連携に関する分析

入院中院内 DOTS は 51.3%、外来治療中地域 DOTS が、38.6%、DOTS あり(入院中:院内 DOTS+外来治療中:地域 DOTS)その他で治療成功率を比較すると、DOTS ありでは 87.4%、その他では 47.5%であった。

治療成功率は、リスクの有無別では、「あり」が 489 人で全体の 84.2%を占めており、治療失敗・脱落中断が含まれた。

2) 患者のリスク項目に関する調査

25 項目のリスクのうち「支援方法の検討あり」の割合が高かったのは、「副作用」「そ

他の合併症「一人暮らし」の順であった。「支援方法の検討なし」では「その他の合併症」の割合が高かった。「介入の結果、リスクの軽減あり」の割合が高かったのは、「副作用」「一人暮らし」「その他の合併症」の順であった。「リスク軽減なし」では「喫煙」が一番高く、禁煙教育に十分踏み込めていない現状が明らかとなった。

3) 自動アルゴリズムの検討

結核患者 4403 人(平成 19 年～23 年)の治療成績(6 ヶ月/9 か月判定)は、治療成功 77.1%、失敗 1.4%、中断 1.4%、死亡 17.2%、不明 2.9%であった。「失敗」後の治療継続例 13 人の最終的な結果を含めた治療成績、治療成功 77.4%、失敗 1.2%、中断 1.3%、死亡 17.2%、不明 2.9%と、わずかながら治療成功が増え、失敗・脱落が減少した。

4) 結核患者の喫煙習慣

結核患者は男女、どの年齢でも明らかに一般よりも喫煙している割合が高かった。年齢調整喫煙率比(結核患者の喫煙者数/一般人口の年齢階級別喫煙率から期待される結核患者の喫煙者数)は、男性 1.29(95%信頼区間 1.44-1.11)、女性 1.57(同 1.89-1.14)。

5) DOTS ガイドラインの検討

外来での DOTS 実施アンケート調査から、ガイドラインの留意点を抽出した。服薬確認方法は、DOTS ノート、空袋、口頭で確認など様々であった。また、外来での患者教育に服薬手帳(DOTS ノート)を用いていると答えた施設が多かった。「保健所との連携の機会」については「DOTS カンファレンスを通して」が一番多く(63 病院) 73.3%、ほかに「未受診時に保健所の

担当者に連絡」「退院時や転院時の情報提供」などであった。

第一健康相談所(以下、一健)の外来での外国人患者を対象とした DOTS カンファレンスの成果として、DOTS カンファレンス開始前の治療中断率は 14%であったが、開始後は 5%に減少した。DOTS カンファレンスで検討し、中断の早い時期に保健所と相互に対応したことで、治療を再開できた事例があり、最終的な中断率は 1~3%であった。

(11) 薬剤耐性の実態調査

次年度実施の調査方法は以下のように企画した。

参加施設：全国の結核療法研究会委員の施設で 3 年以内に薬剤感受性試験に関する精度保障に合格した施設

調査対象：研究期間内の全結核菌培養陽性症例で、未治療患者;6672、既治療患者; 865 を目標とする。

感受性検査は各施設が日常実施している方法で行う。参加施設からの患者情報は、性別、生年月日。登録保健所名のみで、これを元に患者が登録されている保健所に結核登録者情報システムからのデータの提供を依頼する。なお、患者を特定し情報を抽出するコンピュータプログラムを作成して各保健所に配布する。データ項目は、①医療機関名、②診断名：肺結核及び肺外結核、③国籍、④国名、⑤職業区分、⑥X 線所見：学会分類部位・性状・拡がり、⑦治療区分：初回治療 or 再治療 or 治療歴不明、⑧合併症：糖尿病・HIV・塵肺・その他、⑨陽性菌検体の種類、⑩塗抹菌量多剤耐性菌は下記施設から専門輸送業者に依頼して結核研究所に輸送し、二次抗結核を含めた薬剤

感受性検査及び遺伝子タイピングを行う。

(12) 院内感染対策に関する研究

分担報告書に添付した最終版を作成し、結核予防会結核研究所のホームページで公開した。

(13) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響について

回収率は50%弱であった。各質問項目に対する回答割合を別添の分担報告の表1のとおりであった。

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

リファブチンは多剤耐性結核患者の53.8%に有効。リネゾリドは91.7%に有効であった。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と考えられる。

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、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。

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。

KSP37蛋白はキラーT細胞、Type I ヘルパーT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞から

産生される蛋白である。結核患者では健康人に比較して血清中のKSP37濃度の低下が認められたことから、結核免疫（抵抗性）に関与をしていることが示唆された。

(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

LTBI群の血液中において特定のmiRNA発現量がこれらのmRNA発現と負の相関を示したことは、miRNAによる抗結核免疫の制御が生体内で見られる可能性を示している。非LTBI群ではこのような相関はみられなかったため、LTBIにおける末梢血中の免疫細胞の遺伝子発現制御は健康状態と異なると示唆された。

Th1系細胞における各miRNA発現がターゲットのmRNA発現制御に関わる可能性、あるいは遠隔の細胞由来のmiRNAがTh1細胞に取り込まれて発現制御する可能性など、今後さらに検討を要する。最近IFN- γ とIL-2の発現パターンによるCD4⁺T細胞サブセットの割合がLTBIや結核の治療経過において病態を反映する可能性が示唆されているため、今後、結核治療経過に伴う*IFNG*、*IL2* mRNA発現量の変化とこれらmiRNA発現量との関連についても検討する予定である。

(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

対数増殖期にある結核菌でもPMAを用いた系で生菌と判定される結核菌の割合は経時的に減少すると考えられた。

培養法とTaqMan PCR法を比較すると、