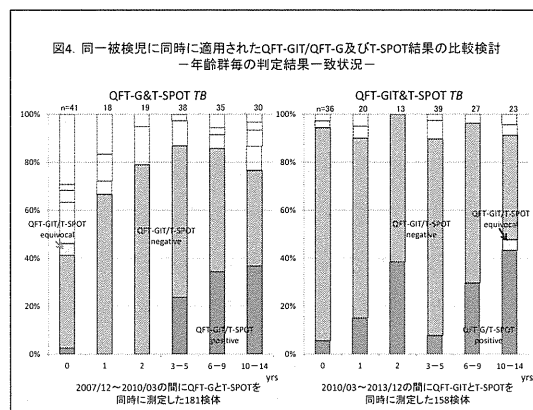


3. 同一被検児に同時に適用された QFT-GIT 及び T-SPOT 結果の比較検討
 検討期間に QFT-GIT と T-SPOT が同時に適用された 158 検体の 2 種の検査結果をクロス集計表 (表 5) に示す (横に 2007 年 12 月から 2010 年 3 月までの間に結核感染診断を目的に QFT-G と T-SPOT が同時に適用された 181 検体の 2 種の結果内訳も示す)。

		第2世代QFTとT-SPOT同時適用例				第3世代QFTとT-SPOT同時適用例			
		T-SPOT				T-SPOT			
		陽性	判定保留	陰性	判定不可	陽性	判定保留	陰性	判定不可
QFT-G	陽性	33	0	5	0	31	0	0	1
	判定保留	1	0	4	0	1	1	3	0
	陰性	19	0	97	1	3	0	115	3
	判定不可	2	0	17	2	0	0	0	0
		55	0	123	3	35	1	118	4
2007/12～2010/03の間にQFT-G&T-SPOTを同時に測定した181検体					2010/03～2013/12の間にQFT-GITとT-SPOTを同時に測定した158検体				

QFT-G とは異なって T-SPOT 結果と乖離した例は極めて少なく、QFT-G でしばしば認められた QFT 陰性/T-SPOT 陽性例や QFT 判定不可/T-SPOT 陰性例は有意に少数であった。また、年齢群ごとの 2 種の IGRA の判定結果一致状況を図 4 に示す (同様に横に QFT-G 及び T-SPOT 同時適用例での年齢群毎の結果一致状況を示す)。QFT-G では 0

～2 才の低年齢群で 2 種の IGRA 不一致例を多く認めていたが、QFT-GIT では年齢群に関わらず 2 種の IGRA 結果が乖離した例はそれぞれの年齢群対象例の 10%未満と非常に少数例であった。



D. 考察

2006 年以降、わが国の結核感染診断に QFT-G が導入され、ツ反の欠点を補う、感度の高い感染診断法として大いに期待された。しかし、小児を対象としては QFT-G 適用データの蓄積に伴って、①0～2 才の乳幼児では幼弱な免疫能も関与して、陽性抗原刺激に対する反応性が乏しく「判定不可」を呈する例が多いことや②未発病感染例 (≒LTBI 症例) 診断感度が年長小児に比して劣っている可能性が高い、ことが明らかとなり、「クオンティフェロン®TB ゴールドの使用指針」(日本結核病学会予防委員会 2011 年 8 月) や「感染症法に基づく結核の接触者健康診断のてびき (改訂第 4 版)」(平成 20～22 年度厚労科研「罹患構造の変化に対応した結核対策の構築に関する研究」研究代表者 結核予防会結核研究所所長 石川信克) においても 5 才未満の小児に対する適用は推奨されていない。2010 年より導入された QFT-GIT は①採血

管内に予め刺激抗原が添加されている、②結核菌特異抗原として、これまでも使用されてきた ESAT-6,CFP-10 の他に TB7.7 が追加され、これら 3 種の特異抗原が 1 本の採血管内にまとめて添加されている、等の点で QFT-G と異なる。QFT-G から QFT-GIT への変更による、小児を対象とした結核感染診断のパフォーマンスへの影響を検討するために今回の検討を実施した。

結果に示した通り、①0~2 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、乳幼児においても判定結果が得られない例は見られなくなった、②結核発症小児を対象としては、QFT-G と同様に良好な感度を有している、③同時に実施した QFT-GIT 及び T-SPOT 判定結果の一致率は非常に高かった、④BCG 接種後早期の接種局所所見推移やツ反結果より真の「コッホ現象」と診断した例では、発病例を除いて 2 種の IGRA が陽性を呈した例は見られなかった、等が明らかとなった。

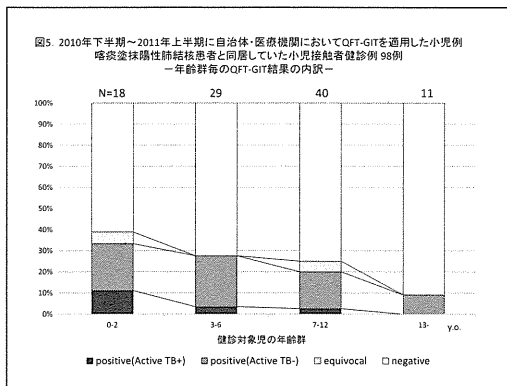
QFT-GIT への変更後、「判定不可」例が極めて少数となった理由としては、QFT-GIT では採血管内に抗原が事前に添加されており、血液採取後に採血管を転倒混和することにより、効率的に抗原刺激を与えることができるようになった可能性が類推される同一検体を対象とした 2 種の IGRA 判定結果比較で、QFT-G では T-SPOT との結果不一致例が多く、また、QFT-G 陰性/T-SPOT 陽性例や QFT-G 判定不可/T-SPOT 陰性例で特に結果乖離例が多かったことより、QFT-G が T-SPOT に比して結核感染診断感度が劣っている可能性が強く懸念されたが、QFT-GIT においては非常に高い一致率が示され、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た。

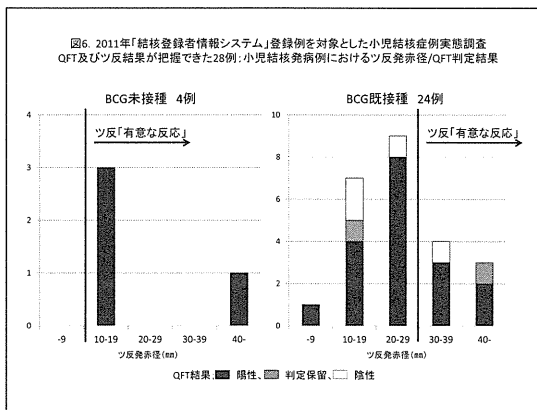
一方で、BCG ワクチン接種後早期の局所所見推移やツ反結果（ワクチン接種後 2 週間以内に実施したツ反で発赤 10 mm 或いは硬結 5 mm 以上の反応を示した）より真の「コッホ現象」と診断された例では発病例を除いて、2 種の IGRA が陽性を呈した例はなく、IGRA が乳児早期の未発病感染例（≒LTBI 例）を正確に検出できない可能性も疑われた。

小児を対象に精度の高い結核感染診断を適用することは、①感染後、成人よりも高い確率で発病に至る小児結核感染例に適切に検出して発病予防を目的とした治療を適用するために、また②早期に重症化に至る発病例を正確に診断して必要十分な発病治療を適用するためにも非常に重要である。

今回の検討結果のほか、我々がこれまでに当分担研究において集積した検討結果、即ち、①2010 年下半年期~2011 年上半年期に自治体・医療機関で QFT-GIT を適用した小児例（382 例）のうち、喀痰塗抹陽性肺結核患者と同居していた小児接触者健診例 98 例では 0~2 歳の乳幼児群においても年長の症例グループと同様に、過去の疫学調査に基づいて推定される感染率（30~50%）に近似する QFT-GIT 陽性頻度を認めたこと（図 5）、



②2011年「結核登録者情報システム」登録小児結核症例を対象とした小児結核全例調査で QFT・ツ反結果が共に把握された例（全28例;BCG未接種4例、既接種24例）でツ反「有意陽性」頻度がQFT陽性頻度を下回っていたこと（図6）、を併せ、乳幼児を含む接触者健診例やコッホ現象事例を対象に積極的にIGRA(QFT-GIT及びT-SPOT)を適用することは発病例を見逃しを減らすために有用な姿勢と考える。



即ち、小児を対象とした結核感染診断におけるIGRA適用に際しては

1) 乳幼児を含む接触者健診例、BCGワクチン接種後の局所所見推移やツ反結果からコッホ現象と判断された例に対してはIGRAを積極的に適用し、IGRA陽性例においては発病の可能性を念頭においた慎重な画像的評価（胸部CTを含む）を行うこと

が望まれる

2) 一方、低年齢小児（5歳未満）では未発病感染例（≒LTBI例）診断におけるIGRAの感度不良の可能性を考慮し、たとえIGRAが陰性であっても安易に「未感染」とは判断せず、ツ反を併用し、さらに児の感染・発病リスク等も勘案した慎重な感染判断を行うことが必要である、と考える。

E. 結論

2010年3月以降2013年12月までに当院において結核感染診断を目的に2種のIGRA（QFT-GIT及びT-SPOT）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い、①0～2才を含む全ての年齢群で「判定不可」例の頻度はQFT-G適用例に比して著明に減少した、②結核発症小児を対象としては、QFT-Gと同様に良好な感度を有していた、③同時に実施したQFT-GIT及びT-SPOT判定結果の一致率は非常に高かった、④BCG接種後早期の接種局所所見推移やツ反結果より真の「コッホ現象」と診断した例では、発病例を除いて2種のIGRAが陽性を呈した例は見られなかった、等が明らかとなった。

これまでの「QFT使用指針」や「接触者健診のてびき（第4版）」では、QFT-G適用小児例での検討結果を根拠として、5歳未満の小児に対するQFT-Gの適用は推奨されず、ツ反を優先して使用することが勧められてきたが、今回の検討結果及びこれまでに当研究班分担研究で集積された他の検討結果と併せ、乳幼児を含む接触者健診例やコッホ現象事例を対象にIGRA(QFT-GIT

及び T-SPOT) を積極的に適用することは発病例を見逃しを減らすために非常に有用な姿勢と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

徳永 修 他. 小児を対象とした結核感染診断における QFT-3G 及び T-SPOT TB の反応態度に関する検討. 第 46 回日本小児呼吸器学会 (2013.11.22 佐賀)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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」

徳永 修 国立病院機構南京都病院 小児科医長

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（第4回）及び近畿地区（第11回）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「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。

研究協力者

森 亨（結核予防会結核研究所）
加藤 誠也（結核予防会結核研究所）
前田 秀雄（東京都福祉保健局）
森川 雪子（東京都福祉保健局）
宮川 知士（東京都立小児総合医療センター呼吸器科）
石立 誠人（東京都立小児総合医療センター呼吸器科）
野澤 智（横浜市大附属病院小児科）
上村 貴彦（さいたま市保健所）
加藤 夕紀子（東京都杉並保健所）
西内 千賀（横浜市金沢区保健福祉センター）
永井 仁美（大阪府医療対策課）
谷掛 千里（大阪府地域保健感染症課）
吉田 留美（大阪府地域保健感染症課）

藤山 理世（神戸市保健所）
宮野前 健（国立病院機構南京都病院小児科）
土居 悟（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）
西屋 克己（香川大学医学部医学教育講座）
石井 紘介（中野こども病院小児科）
岡田 隆文（国立病院機構四国おとなと子どもの医療センター小児科）
佐野 智子（西神戸医療センター小児科病棟）
池田 暁美（大阪市保健所）
左古 恵里佳（大阪府八尾保健所）
江口 理香（神戸市須磨区北須磨保健センター）
國方 未来（香川県中讃保健福祉事務所）

A. 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。

B. 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、治療支援、症例発見後の事後対応など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。

C. 研究結果

1)第4回首都圏小児結核症例検討会

平成25年12月14日に東京都健康安全研究センターにおいて開催した。本年度も関東地区一円より約120名が参加した。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（東京都立小児総合医療センター、東京都杉並保健所）

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（東京都立小児総合医療センター、埼玉県さいたま市保健所）

③感染源症例の薬剤耐性が判明した兄弟発病・感染例（横浜市立大学病院附属病院、横浜市金沢区福祉保健センター）

であった。

また、症例の呈示・討議が終了したのち、分担研究者（徳永）より「小児結核感染及び発病の診断」とのテーマの講演を受けた。小児を対象とした結核感染診断におけるIGRA（QFT-GIT及びT-SPOT）の適用も含め、感染・発病診断の注意点に触れた内容であった。

2)第11回近畿小児結核症例検討会

平成25年2月8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 120 名が参加した。これまで、症例検討会では近畿地区で過去 1 年間に発生した小児結核事例が呈示されていたが、今回は四国地区（香川県）からも事例呈示がされた。

呈示された症例は、

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（大阪府立呼吸器アレルギー医療センター、大阪府八尾保健所）

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（中野こども病院、大阪市保健所）

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（西神戸医療センター、神戸市須磨区北須磨保健センター）

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（国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター、香川県中讃保健所）

であった。

また、症例の呈示・討議が終了したのち、神戸市保健所 藤山理世先生、大阪府地域保健感染症課 谷掛千里先生から「医療機関等における感染性結核患者発見後の小児（特に乳幼児）を対象とした集団接触者健診」に関するレクチャーを受けた。特に、小児を対象とした健診の特殊性や留意点、初期対応のポイント、健診対象者（保護者）への情報提供などについて、それぞれの地域で過去に経験された事例なども紹介しながら講演をおこなって頂いた。

D. 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。我々が継続して実施している「結核登録者情報システム登録例を対象とした小児結核全例調査」においても、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（父母が高蔓延国から転入した例も含む）、さらに BCG 未接種小児などを「結核感染・発病に至るハイリスク集団」と捉え、有効な対策を講ずることが重要であると考えられる。この近畿、首都圏小児結核症例検討会は小児結核症例が特に集積している地域の保健、小児科臨床関係者を対象に小児結核への関心を喚起し、正確な知識を普及することを目的に、また、残念ながら発病に至ってしまった小児結核症例が抱えている予防・診断・治療などの問題点・課題を明確にし、さらに保健・臨床関係者の間で共有して今

後の対策に活かすことを目的として継続的に開催されている。

今年度開催された症例検討会においても、過去1年間に発病に至った7症例が呈示された。これらの症例からは「コッホ現象」、「薬剤耐性小児結核症例の治療レジメ」、「脆弱な家庭機能の支援」、「外国籍症例」、「診断の遅れ (Doctor's delay)」、「小児結核診療体制の維持・整備」、「学校との連携 (特に疫学調査の実施や教育機会の保障に関して)」などのキーワードが抽出可能であった。また、医療従事者の結核発症例もしばしば報告され、小児を含む接触集団を対象とした接触者健診に苦慮する機会も増えていることも受けて、「医療機関等における感染性結核患者発見後の小児 (特に乳幼児) を対象とした集団接触者健診」を講演テーマと設定して情報提供も行った。

さらに確実に小児結核症例を減少させるためには、保健・小児科臨床関係者の小児結核に対する関心や知識を維持すると共に、発病に至った症例が抱える問題点を明らかにして、小児結核を含む結核対策行政施策へ反映させることも重要と考える。今年度の検討会で抽出されたキーワードのうち、「BCG ワクチン接種後のコッホ現象疑い例に対する適切な対応方法の確立 (対応状況の実状把握も含め)」、「高蔓延国からの転入者に対する結核検診導入の是非」、「小児結核診療体制の維持・整備 (小児結核症例に対応可能な、或いは相談可能な小児医療機関の確保)」などは今後のわが国の結核対策を構築していく上でも検討すべきテーマと考える。

E. 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、残念ながら発病に至ってしまった小児結核症例が抱えている予防・診断・治療などの問題点・課題を明確にし、さらに保健・臨床関係者の間で共有して今後の対策に活かすことを目的に、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「コッホ現象」、「薬剤耐性小児結核症例の治療レジメ」、「脆弱な家庭機能の支援」、「外国籍症例」、「診断の遅れ (Doctor's delay)」、「小児結核診療体制の維持・整備」、「学校との連携 (特に疫学調査の実施や教育機会の保障に関して)」などの課題が抽出可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者 御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

研究協力者 加藤朋子 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

研究要旨

結核菌が生菌（発育可能）であるかどうかを臨床的に評価するには、現状として培養検査を実施するより方法がない。しかしながら、培養検査で「陰性」であることを判断するためには一般に固形培地で8週間の培養期間を必要とするため、迅速性の点で問題がある。これは臨床的には入院している結核患者の退院時期の判定に影響するため、従来判定の迅速化に対する要求があった。昨年度より Propidium monoazide (PMA)が PCR 反応を抑制する性質を利用し、結核菌の生死を判定する方法に関する検討を行っており、今年度も継続して検討を行った。

培養液中の結核菌生菌の比率を評価するため、昨年までに検討したPMAの結核菌における至適濃度 100 μM 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。結果として、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。同時に対数増殖期の結核菌においても多くの結核菌で死菌判定されることが判明した。結核菌濃度とPMAの作用の相関に関する検討では、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。また、予備的に治療前の結核患者から採取した喀痰検体でPMA-PCR定量系を評価したが、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。

A. 研究目的

結核患者の治療効果を評価する場合、一般には固形培地による培養検査が実施されるが、一般に固形培地での陰性判定には8週間の時間を要する。この間、排菌陽性で入院した患者は入院のまま待機することを余儀なくされる場合がある。もし結核菌の生死を培養以外の方法で迅速に判定することが可能であれば、それは入院期間の短縮につながる可能性があり、非常に有用である。現在結核の診断に広く用いられている核酸増幅法による結核菌検出法は、

結核菌の検出は数時間で行えるが、死菌も増幅されるため、原則的に治療経過観察には使用できない。

一般細菌では生菌のみを増幅する方法として、DNAの二本鎖に結合し、PCRによる増幅を阻害する propidium monoazide (PMA) あるいは、ethidium monoazide (EMA)を用い、生菌のみをPCRで検出する方法が開発されている。PMAあるいはEMA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の二本鎖に結合する。当該DNAは光照射に

より架橋形成され、PCR による熱解離の影響を受けない。PMA および 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おり、これを結核菌に応用した。

昨年度までに PMA は培養結核菌の加熱死菌の遺伝子増幅を抑制することを証明したが、生菌の遺伝子増幅も抑制することが問題となっていた。今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、本実験系が利用できるかを検討した。

B. 方法

【対数増殖期にある結核菌の生菌の割合の検討】

＜菌液の調製＞

M. tuberculosis H37Rv を Middlebrook 7H9 培地に接種し、 $OD_{530} = 0.05$ に調製した (5 mL)。スクリーキャップ付試験管で 37°C で培養し、3 日目、5 日目、7 日目および 21 日目に培養液のサンプリングを行い、① PMA を用いた TaqMan MTB (Roche Diagnostics) 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。

＜PMA-PCR 系による生菌数の定量＞

100 μ L の菌液をマイクロチューブ 6 本に分注し、3 本には終濃度 200 μ M の PMA を添加した。Vortex ミキサーで攪拌後、室温・暗所で 5 分間インキュベートした。氷上で 600W のハロゲンランプを 20 cm の距離から 1 分間照射したのち、菌液を遠心し (14,000 rpm, 5 分)、滅菌水で洗浄した。

さらに遠心し上清を除去したのち、アンプリコマイコバクテリウム検体前処理試薬セット II (Roche/#83267) およびタックマンマイコ用検体前処理試薬添加剤セット「SOL-M」(島津製作所/#495527) を用いて 200 μ L の DNA 抽出液を得た。リアルタイム PCR システム (Roche/コバス TaqMan48) を用いて遺伝子量の定量を行った。試薬はコバス TaqMan MTB (Roche/#490249) を用い、陽性コントロールが 20 copy/reaction であることから、陽性コントロールの Ct 値との差からサンプル中の DNA 量を換算した。

＜Auramine O-CTC 二重染色＞

菌液 200 μ L をマイクロチューブに分注し、培地を洗浄後、滅菌生理食塩水に再懸濁した。CTC 溶液および Enhancing reagent B (同仁化学研究所) をそれぞれ 4 μ L および 1 μ L 添加した。37°C で 30 分間インキュベート後、10 μ L をスライドガラスに滴下し (必要に応じて滅菌水で希釈)、自然乾燥させた。4%ホルマリンで 5 分間固定し、乾燥後、Auramine O 染色 (Scientific Device Laboratory) で 1 分間染色し、水洗後、自然乾燥させた。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。ランダムに撮影した写真から 200 個以上の Auramine O 陽性細菌を計数し、そのうちの CTC 陽性細菌数を生菌の割合とした。

＜7H10 培地における CFU 測定＞

各菌液を滅菌水で 10~100,000 倍に段階希釈し、それぞれ 100 μ L を培地に接種した。3 週間後にコロニー数が 20~200 個のプレートのコロニー数をカウントし、菌量

を算出した (n = 3)。

【菌濃度の違いによる PMA の効果】

<菌液の調製>

M. tuberculosis H37RvをMiddlebrook 7H9培地に接種し、OD₅₃₀ = 0.05 に調製し、37°Cで培養した。OD₅₃₀が0.170 越えた時点で実験を行った。この時の菌量は 10⁷-10⁸ cells/mL程度であると想定し、これを 7H9培地で 10 倍、100 倍、1000 倍、10,000 倍および 100,000 倍希釈した 6 つの濃度の菌液を準備した。試験は 2 回実施し、1 回目は生菌のみを使用した。2 回目は生菌と、5 分間沸騰湯煎で加熱した死菌の両者について、PMAの効果を検討した。

<PMA-PCR 系による生菌数の定量>

100 μL のそれぞれの濃度の菌液をマイクロチューブ 9 本に分注し、3 本は終濃度 100 または 200 μM の PMA を、別の 3 本に 200 μM の PMA を添加した。その後の DNA 抽出までの操作は実験 1 と同様である。

Auramine O-CTC 二重染色と 7H10 培地における CFU 測定は前述の通り。

【臨床検体への応用】

<臨床検体>

複十字病院に入院した結核患者 3 名から、抗結核療法開始前に喀痰を 50 mL コニカルチューブに採取した。(包括同意による任意採取)

<PMA-PCR 系による生菌数の定量>

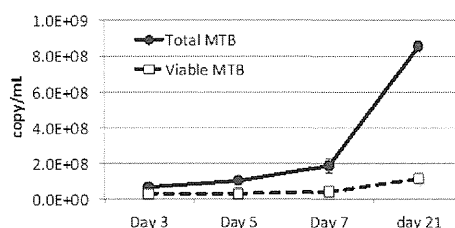
喀痰と等量の NALC-NaOH (マイコプレップ, ベクトン・ディッキンソン) を加えてボルテックスし、15 分間静置した。3,000xg で 15 分間遠心し、上清を捨て、沈渣を 1 mL のリン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸

濁した。このうちの 100 μL をマイクロチューブ 2 本に分注し、1 本には終濃度 100 μM の PMA を添加した。その後の DNA 抽出操作は前述の方法と同様である。

C. 結果

【対数増殖期にある結核菌の生菌の割合の検討】

閉鎖系における培養を行い、濁度計による OD の変化を観察した。培養 3 日目、5 日目、7 日目および 21 日目における濁度はそれぞれ、0.147、0.210、0.240 および 0.306 であった。また、同じ検体により TaqMan PCR 法における全菌数および生菌数の定量を実施した。培養 3 日目、5 日目、7 日目および 21 日目における全菌数および生菌数の定量結果を図 1 に示した。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。



	Day 3	Day 5	Day 7	Day 21
Total MTB	6.6E+07	1.0E+08	1.9E+08	8.5E+08
Viable MTB	3.1E+07	3.1E+07	3.8E+07	1.1E+08
% of viable MTB	46.5	30.8	20.4	13.2

図 1. 培養日数と PMA-PCR 定量 (n = 3)

PMA-PCR 定量の結果を保証するため、Auramine O-CTC 二重染色による呼吸活性から生菌・死菌数を定量した。Auramine O-CTC 二重染色の典型像を図 2 に示した。緑が Auramine O 染色陽性の結核菌、赤い点

が重なっているのが呼吸活性を持った菌となる(矢印)。また、この方法で算出した全菌数に占める生菌の割合は表1のようになった。TaqMan PCR (PMA-PCR 定量)の結果と同様に生菌数の割合は経時的に減少しており、その死菌/生菌の比率はPMA-PCR 定量の結果とほぼ同じであった。

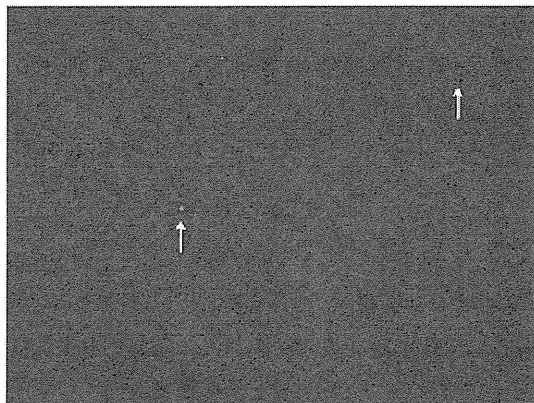


図 2. 増殖期にある結核菌の Auramine O-CTC 二重染色写真

表 1. Auramine O-CTC 二重染色を用いた増殖期にある結核菌の生菌数の割合

	Day 3	Day 5	Day 7	Day 21
AO (+)	207	274	207	221
CTC (+)	93	92	29	37
% of viable MTB	45	34	14	17

7H10 培地に発育したコロニー数を計数した。TaqMan PCR による生菌数と併せて図3に示した。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。

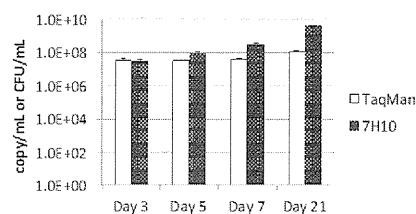


図 3. 増殖期の結核菌の生菌数の変化および培養法と核酸増幅法による定量の比較

【菌濃度の違いによる PMA の効果】

$10^3 \sim 10^8$ cfu/mLの各結核菌濃度(生菌)におけるPMA-PCRによる定量値(生菌比率)を図4に示した。

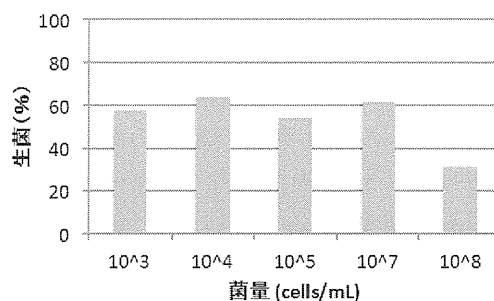


図 4. 結核菌(未殺菌処理)の菌濃度の違いによる PMA の効果の違い(1回目)

菌量に関係なく、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。しかしながら、2回目の実験(図5)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。

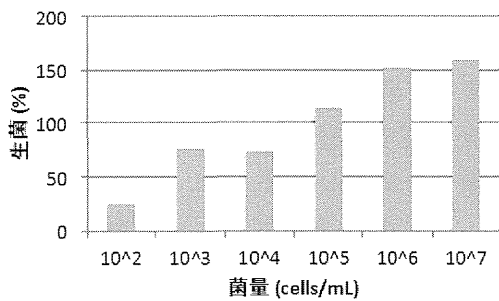


図 5. 結核菌（未殺菌処理）の菌濃度の違いによる PMA の効果の違い（2 回目）

図 6 に死菌（加熱処理）による PMA の効果を示した。TaqMan PCR での定量値に対する PMA-PCR で定量された割合は菌量が $10^2 - 10^8$ cells/mL において、15~44% と計算された。

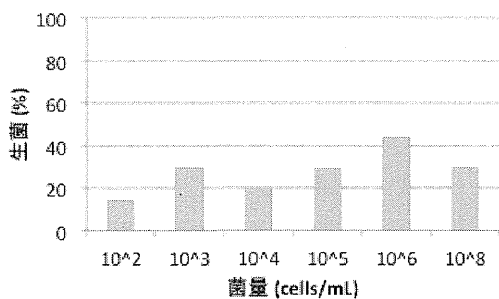


図 6. 結核菌死菌（加熱処理）の菌濃度による PMA 効果の差異

【臨床検体への応用】

抗結核薬による治療以前の患者から採取した喀痰中の結核菌について、PMA+/-での TaqMan PCR による定量値と、そこから算出される生菌率を表 2 に示した。

表 2. 結核患者の喀痰中の結核菌の全菌数および生菌数とその割合

患者	全菌数 (cfu/ml)	生菌数 (cfu/ml)	生菌率 (%)
1	2.3×10^3	6.1×10^2	26.8
2	15	47	-
3	1.2×10^4	2.6×10^3	22

患者 1 および 3 の生菌の割合はそれぞれ、26.8% および 22.0% であった。患者 2 の菌量は患者 1 および 3 に比べて少なく、PMA 添加時の定量値が非添加時より高値を示した。

D. 考察

PMA による real-time (TaqMan) PCR 定量系の評価のため、生菌・死菌判定に関する基礎的検討を継続して行った。TaqMan PCR 法及び Auramine O-CTC 二重染色の結果から、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、培養 5 日目以降に乖離が見られたことから、菌数が少ないときと多いときで PMA の作用が異なる可能性があるか、菌濃度が高いときの DNA 抽出効率が低下する可能性が考えられた。今回の実験以外に好気条件で培養した結核菌による実験を行ったが、PMA により死菌と判定された菌の比率は閉鎖系の場合と同じであった (data not shown)。これらの実験結果から、対数増殖期にあるにも関わらず、結核菌の半数から 8 割の菌が生物活性を持たないと考えられた。このような状態の結核菌から調製された低濃度の菌液で生菌比率が高く検出されることを考慮すると、結核菌の細胞密度による生物活性の制御系の存在が考えられた。

上記の結果を受け、菌濃度の違いによる PMA の効果を検討した。2 回行った試験の結果が異なることから、これらの結果だけでは PMA の効果が菌濃度に影響されるのかは不明である。今回示した実験以外に 2 回の実験を行っているが、菌濃度と生菌率に一定の関係性は見いだせなかった (data not shown)。これらの結果から、少なくとも PMA に菌濃度依存性の特性はないものと考えられた。

上記の検討から得られた知見を応用し、臨床検体での予備的検討を行った。喀痰 3 検体での PMA-PCR 結果から、喀痰中の結核菌の生菌の割合は 2 割程度であることが明らかとなった。今回の検討では対数増殖期にある結核菌でも半数程度しか生物活性を持たないことが示されている。活動性結核患者の生体内での結核菌感染状態は、活動性・半休眠・休眠・死菌の混合状態と考えられ、ヒトの体内では免疫機能が働いていることもあり、この結果 (2 割程度) は妥当と考えられた。患者 2 は排菌量が少なく、全菌数より生菌数が多い計算結果となったが、これは定量系の限界によるものと考えられた。この定量結果から、排菌数が 100 cells/mL 以下 (PB に懸濁時の濃度) の場合、定量の精度は低いと考えられる。今後、臨床検体の数を増やして、PMA 処理の至適条件を検討していく予定である。

E. 結論

PMA による結核菌の死菌・生菌比率の評価について、基礎的検討を継続して行った。今回の検討では、結核菌の培養状態 (期) あるいは菌濃度による生菌・死菌比率の違いに関する新知見が得られた。また、喀痰検体についても適用可能であることが示された。今回の検討からは、PMA の効果

が試験毎に異なる可能性も示されたため、安定したデータが得られるよう条件を検討する必要がある。

次年度は臨床検体の薬物投与後の生菌の割合の変化の検討、および薬剤感受性試験への応用の可能性について引き続き検討する予定である。

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, 山田博之, 御手洗聡. PMA-PCR による結核菌の生菌及び死菌の鑑別. 日本細菌学会雑誌 2014; 69(1): 139. 第 87 回日本細菌学会総会 東京 2014 年 3 月 27 日

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
結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

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 結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科 科長

研究要旨

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。本例は接触者調査により初発患者から家族内3名、出張先の同僚1名への感染が起こったと推定されている。家族内感染の1例は、潜在性結核感染症であったため、それ以外の初発患者株も含めた分離結核菌の型別を行い、IS6110制限酵素断片長多型（RFLP）分析で同一パターンであることを確認した。これらの株の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。本株の遺伝系統は、RD181陰性で北京型-modern株という欧米において病原性が高く多剤耐性に関連していると報告されている菌株と同一遺伝系統であった。しかし、RD150領域も欠損した株であることからマイナーな系統であった。集団感染事例で同一感染源由来と判定されたにも関わらず、1株が36箇所の変異配列多型（VNTR）分析で、1箇所だけVNTR-3232ローカスのコピー数が異なることがわかった。さらに、これら4株は次世代シーケンサー（NGS）で全ゲノム解析を行い塩基多型（SNP）部位の比較で、結核菌の遺伝的な進化状態と疫学調査結果の関連を調べた。その結果、本例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。

A. 研究目的

結核菌が持つ病原性因子に関する報告が数多く存在している。しかし、結核菌の病原性を客観的に評価できる統一した方法はなく、感染実験において動物生存数や感染臓器での残存菌数の比較等で評価されている。一般的に、ヒトに対して病原性が高いといわれる菌が持つ共通の性質として、ヒトからヒトに容易に感染が起こり、免疫システムで排除されず、さらに発症までの期間が短いものなどが考えられる。つまり、

結核感染事例で同一遺伝型株による感染者数が多い場合や疫学調査の結果により接触時間が短いと判明した場合などでは、注目している菌株は感染性が高いと考えることができる。

本研究ではこのような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することで、感染経路の推定にNGSが利用できるかどうか。また、検出された

非同義置換を伴う一塩基多型 (SNP) を指標として、感染力に関与すると推定される遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

・本研究の分析に用いた結核菌株について

疫学調査により、本人 (Index case、9月に登録) から2人の家族に感染が生じ発症した。それぞれの株は、M-1 (8月登録)、S-1 (9月登録) と表記した。また、もう1人の家族は QFT 陽性であり、潜在性結核感染症 (LTBI) として登録された。さらに Index case は、出張先の同僚と3回 (8時間/回) 接触を持ち、この同僚も発症した (12月登録、分離菌は T-1 と表記) (図1)。Index case の菌も含めて菌が分離できた4株を解析した。

・菌株の遺伝子型

得られた4株の結核菌について、スポリゴタイピング及び Large sequence polymorphisms (LSP) を調べた。LSP は、北京型結核菌の進化過程で、高頻度に欠損が生じることが知られている RD181 及び RD150 部位の有無を PCR 法で調べた。また、NTF 領域への IS6110 の挿入の有無を調べることで、ancient 型か modern 型かの同定を行った。

・反復配列多型 (VNTR) 分析

36 ローサイ (VNTRs-0424, 1955, 2074, 2163b, 2372, 3155, 3336, 4052, 4156, 2163a, 3232, 3820, 4120, 1612, 1895, 2401c, 2347, 3171, 3690, 1982 及び MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, MIRU 39, MIRU 40, ETR A, ETR B, ETR C, ETR F) について、VNTR 法で分離株のコ

ピー数を調べた。

・次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析

精製した各ゲノム DNA 2ug を超音波処理して断片化し、末端にアダプターを結合させた。この得られた DNA プラグメントを HiSeq 2000 (イルミナ社) で分析を行った。

C. 研究結果

1. 感染した株の遺伝子型

スポリゴタイピングで Index case を含めた4株の遺伝型を調べると、すべての株が北京型 (36 から 43 のダイレクトリポートがすべて陽性) であった。また、NTF 領域に IS6110 の挿入があり、世界的に広まっている modern 型の結核菌だった。LSP 分析では、北京型結核菌で主流の RD181 領域を欠損した遺伝型であるが、さらに RD150 領域も欠損しており、日本国内の北京型結核菌ではマイナーな系統の株であることが確認できた。

2. 結核菌の型別分析

ハイパーバリアブル (HV) を含めた 36 ローサイについて、VNTR 法で4株のゲノム DNA を解析した。HV の1箇所 (VNTR-3232) を除き、他の 35 ローサイのコピー数はすべて4株間で一致した。この VNTR-3232 では、Index case、家族内感染例の M-1 株及び S-1 株のコピー数は 18 だったが、会社同僚の T-1 株では 14 で、コピー数が異なることが確認できた。

3. 全ゲノム解析

Index case、M-1、S-1 及び T-1 株について NGS で全ゲノム解析を行い4株間での SNP 部位とその数を調べた。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。

本年の研究では、Index case の分析結果を含めて解析することで Index case と家族内感染 (M-1 及び S-1) 間で 5 箇所の共通する SNP を見出した。また、M-1 だけが持ち Index case と S-1 には存在しない SNP (4211195) が 1 箇所あった。出張先の同僚 (T-1) に関してこれら家族内で共通の 5 箇所及び M-1 にだけ存在する 4211195 位の SNP は存在せず、H37Rv の塩基配列と同じだった (表)。検出された 5 箇所の SNP 部位 (① Rv1184c, 217: V => A、② Rv1291c, 18: A => S、③ *trpE*, 259: Q => E、④ *coaE*, 312: D => G、⑤ Rv3015c, 283: V => A) 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。特に *trpE* (アントラニル酸シンターゼ) はグルタミンがグルタミン酸へ、*coaE* (デホスホ - CoA キナーゼ) はアスパルギン酸がグリシンへと電荷変化を伴うアミノ酸変異なので、酵素の二次構造が変化する可能性が高い。

D. 考察

本研究の対象とした結核菌は、疫学調査及び IS6110 RFLP 法による型別分析で同一パターンとなり、集団感染例と推定された例である。結核菌株の系統は、ヨーロッパや米国などで世界的に広まっている北京型-modern 株であり、日本国内で主要な遺伝

型である北京型-ancient 株ではなかった。また、本株は、結核菌進化の主要経路から外れた RD150 欠損株で日本国内では出現頻度が非常に低い系統の結核菌だった。

家族内感染事例で、高頻度変化部位 (HV) 領域の VNTR のコピー数が異なる例が報告されている。本例の 4 株でも IS6110 RFLP パターンは同一、35 箇所の VNTR プロファイルは同じであるが、出張先の同僚から分離された 1 株の HV 領域の VNTR-3232 だけがコピー数が異なった。VNTR 法による型別では分析ローカス数やその選択によって識別能が大きく異なることが知られている。HV 領域を加えることで VNTR 分析の識別能は高くなるが、1 箇所だけの違いで非関連株と判断することはできないため、型別結果の解釈が難しくなると考えられる。そこで、もっと確実に型別できる方法として NGS 分析が、最近注目されてきた。

結核菌が増殖する際、ゲノム上に変異 (SNP) が入り、その変異が継代され時間経過に伴って蓄積していく。NGS によるゲノム解析の結果、Index case と S-1 は H37Rv に比べて 5 箇所の SNP、さらに M-1 間で 1 箇所の SNP が存在したことから、Index case から最初に S-1 にその後 M-1 へ、ほぼ同時期に感染が生じたものと推定される。他方、出張先の同僚 (T-1) から分離された結核菌は、家族内感染株で見られた 6 種類の SNP は持っていなかった (表)。ゲノム上に存在する SNP 数で Index case、M-1、S-1 及び T-1 を遺伝系統的に並べると、変化度合いが低い (H37Rv に遺伝的に近い) ものから順に T-1、Index case = S-1、M-1 となる (図 2)。つまり、遺伝系統上 T-1 から Index case へ変化することは考えられるが、疫学調査から推

定されている Index case から T-1 へ結核菌の変化は起こらないと考えられる。このように、本事例は SNP から推定される菌の遺伝系統進化状態と接触者調査による疫学情報が一致しない例であった。ゲノム上の変異 (SNP) は、菌の増殖に伴い発生する。ヒトからヒトへの感染においてどの段階で変異が生じているのか、例えば、1) Index case の体内で微小変化した複数株が存在し、それらが他のヒトへの感染に関与する、2) 体外で浮遊している際に変異が生じる、3) 2 次感染者の体内で変異が生じるなどが考えられるが、未だに詳細は明らかになっていない。今後、同様なケースの分析を進めることでこれらのメカニズムが解明されると考えられる。

E. 結論

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 NGS によるゲノム解析を行った。VNTR 分析ではローカスによって、コピー数変化頻度が異なり HV 領域のローカスでは家族内感染事例でも異なることが確認できた。また、NGS を使ったゲノム解析によって得られた SNP の有無で推定された結核菌の遺伝的な進化状態と疫学調査結果が一致しない例があることから、これら両方の結果を総合的に判断して株間の関連と感染経路を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Wada T, Maeda S: Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats genotyping: analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. 2013, 34: 1171-1174.
2. Fujikawa A, Fujii T, Mimura S, Takahashi R, Sakai M, Suzuki S, Kyoto Y, Uwabe Y, Maeda S, Mori T: Tuberculosis contact investigation using interferon-gamma release assay with chest x-ray and computed tomography. PLoS One. 2014, 9: e85612.

(2) 学会発表

1. Maeda S, Wada T, Naka T, Shibata M, Fujiwara N: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*, especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer. 5th EMBO meeting. 2013, Amsterdam.
2. 和田崇之, 岩本朋忠, 前田伸司, 長谷篤, 山本太郎: 結核菌における遺伝型別一致株の比較ゲノム解析. 第87回 日本細菌学会, 2014. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

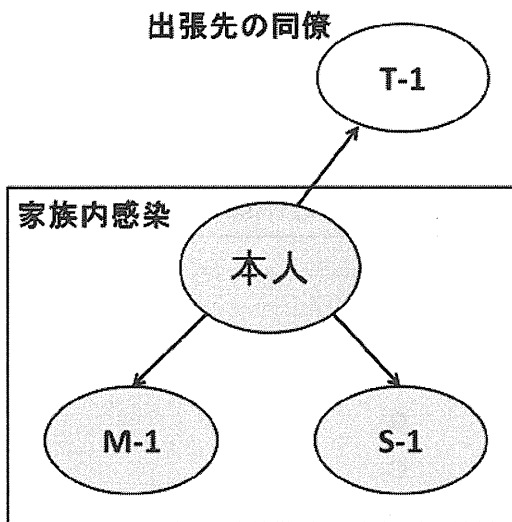


図 1. 疫学調査から推定された結核の感染経路

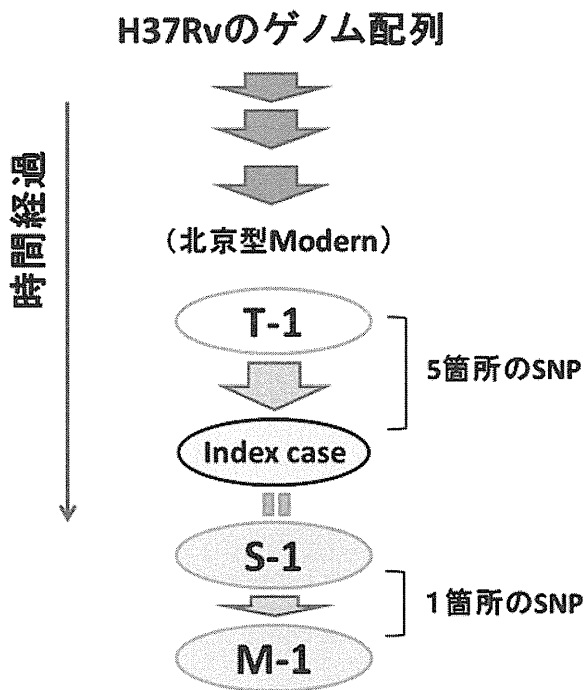


図 2. 全ゲノム比較から推定された結核菌の系統進化

NGS 分析で得られた SNP の有無から考えられる関連する結核菌の系統進化

表. 4 株の分離菌の SNP 部位の塩基

NGS 分析で判明した家族内感染で共通な SNP 部位

	SNP position					
	1324962	1445783	1808677	1835947	3374817	4211195
Wild type (H37Rv)	A	C	C	A	A	C
Index case	G	A	G	G	G	C
M-1	G	A	G	G	G	A
S-1	G	A	G	G	G	C
T-1	A	C	C	A	A	C