

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）  
平成 23 年度-平成 25 年度総合分担研究報告書

研究課題：アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究（H23 - 新興—指定—020）

研究代表者：国立感染症研究所・副所長 倉根 一郎

分担研究課題：非結核性抗酸菌感染症の研究

研究分担者：国立感染症研究所・免疫部長 小林 和夫(H23-24)、阿戸 学(H25)

研究協力者：台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室・請負人 周 如文

研究協力者：国立台湾大学医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源

研究協力者：国立感染症研究所・免疫部主任研究官 松村 隆之

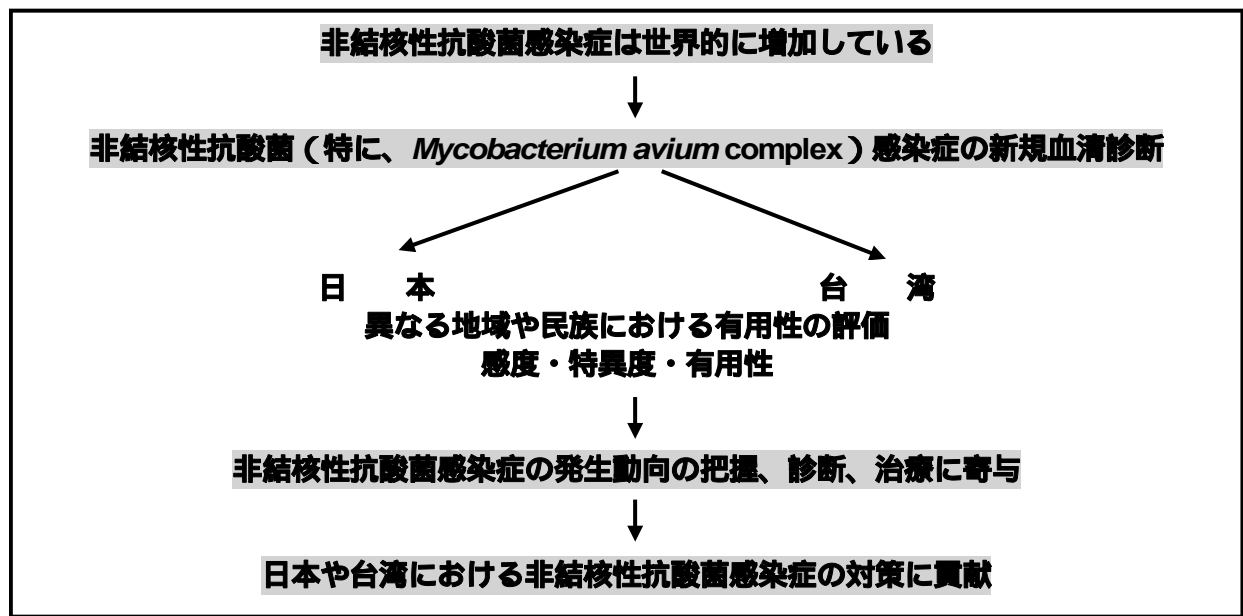
研究協力者：新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学教授 松本 壮吉

研究協力者：国立病院機構刀根山病院・副院長 前倉 亮治

研究協力者：国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医長 北田 清悟

研究要旨

- 活動性非結核性抗酸菌（特に、*Mycobacterium avium complex* : MAC）感染症の迅速簡便血清診断（所要：約 3 時間）の研究開発・性能評価に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局 周 如文 博士、国立台湾大学病院医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源 博士と日台共同研究を推進した。研究分担者は血清診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の開発に寄与し、本キットは体外診断用医薬品製造販売承認（厚生労働省）され、保険医療対象検査項目となった。さらに、民間検査機関（BML）の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。しかし、本キットの異なる地域や民族における有用性に関する国際評価は未了である。共同研究の成果として、1）台湾の MAC 感染症患者血清を収集、2）MAC 抗体価を測定し、感度：61%、特異度：91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であることが示された。



## A. 研究目的

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20% (世界: 100-200 万人) を占め、世界的に増加している。日本では、年間約 9000 人を越える新規患者が発生していると推定されている。特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成される。アメリカ合衆国胸部疾患学会および感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致した活動性 MAC 感染症に関し、感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体検出の診断キットを開発した。国内検体では診断感度: 84%、特異度: 100%、また、所要時間は 3 時間 (従来法では約 1 か月) であり、高い臨床的有用性を示し、厚生労働省は体外診断用医薬品製造販売承認し、保険医療品目として収載されている (2011 年 8 月)。加えて、2012 年 9 月から民間検査機関 (BML) の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。

この診断キットは GPL 特異的 IgA 抗体応答を指標しているため、人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。加えて、非結核性抗酸菌感染症は地域により、原因菌種の頻度が異なることが知られている。

本診断キットの国際的有用性を検証するため、日本と異なる地域や民族 (台湾) における性能評価を目的とした。

## B. 研究方法

### 活動性抗酸菌感染症の血清

抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) 患者の血清を収集する。

### キャピリア® MAC 抗体酵素免疫測定 (ELISA) による血清抗体価の測定

MAC 感染症の MAC 特異抗原に対する血清 IgA 抗体を検出する迅速血清診断キット (所要: 約 3 時間、カットオフ値: 0.7 U/mL、キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ) を用い、血清抗体価を測定する。

### 倫理面への配慮

ヒトを対象とする医学研究倫理に関し、国立感染症研究所や国立台湾大学病院で機関承認を得ている。なお、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 対象患者候補の選定

血清検体の収集に先立ち、ヒトを対象とする医学研究倫理審査申請書の作成について、電子郵便による事前協議を終了し、2012 年 2 月 07-09 日に渡台し、台湾行政院衛生署疾病管制局や国立台湾大学病院附設医院内科と最終協議し、大筋合意した。その後、台日の双方において研究計画に関するヒト

を対象とする医学研究倫理審査が承認された。

引き続き、抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) 患者候補を選択した。診断基準 (2007 年) に合致した活動性肺 MAC 感染症: 57 症例、MAC 混入 (contamination): 11 症例、*M. kansasii* 感染症: 14 症例、迅速発育型 GPL 保有非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum* など) 感染症: 26 例、活動性結核: 48 症例、結核患者の濃厚接触者: 42 症例から血清を収集した。

### キャピリア® MAC 抗体酵素免疫測定 (ELISA) による血清抗体価の測定

活動性肺 MAC 感染症で血清抗体陽性は 34、陰性は 23 症例、MAC 混入 (contamination): 陽性は 1、陰性は 10 症例、*M. kansasii* 感染症ではすべて陰性であり、迅速発育型非結核性抗酸菌感染症: 陽性は 7、陰性は 19 症例、活動性結核陽性: 5、陰性は 10 症例、結核患者の濃厚接触者: 陽性は 2、陰性は 42 例、血清診断キットの感度は 61%、特異度は 91% であった。

## D. 考察

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20% を占め、世界的に増加している。特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。NTM 感染症の診断は米国胸部疾患学会 / 感染症学会の診断基準 (2007 年) により、診断される。その骨子は 1) 臨床症状 (慢性咳嗽、喀痰、発熱など)、2) 画像所見 (浸潤、空洞、気管支拡張) および 3) 細菌学的所見 (喀痰培養: 2 回以上陽性) から構成されている。MAC は遅発性 (集落形成に約 2 週間が必要) であり、細菌学的所見 (喀痰培養: 2 回以上陽性) を満足するため、MAC 感染症の確定診断に約 1 か月が必要となる。

この血清診断キットは MAC 特異的細胞壁抗原 (GPL) を用い、特異的血清 IgA 抗体応答を指標としている。日本国内の多施設共同研究による性能評価では感度: 84%、特異度: 100%、迅速性 (所要時間: 3 時間) など、高い有用性を示している。しかし、宿主抗体応答は人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。

台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91% であった。この成績は日本や米国における性能評価に比し、特に、感度 (日本: 84% や米国: 77%) が低下していた。この原因として、台湾では GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌感染症が高頻度であること、本調査での活動性肺 MAC 感染症患者に免疫不全患者が比較的多い (32%) 大学病院で実施されたことが示唆された。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であったといえる。

今後の課題として、台湾の多施設共同研究 (市中病院を含む) によるキットの性能評価、カットオフ

値の検討や GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* など) 感染症の感度・特異度の解析を進め、台湾における血清診断キットの有用性を最終的に検証することなどが挙げられる。

## E. 結論

- 活動性非結核性抗酸菌感染症の血清診断に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室と国立台湾大学病院で日台共同研究の実施で合意し、台日の双方において研究計画に関するヒトを対象とする医学研究倫理審査が承認された。
- 台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shu, C.C.\*, **Ato, M.\***, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., **Kobayashi, K.**, Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (\*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work). 2013. Sero-diagnosis of *Mycobacterium avium* complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan. PLoS One 8(11): e80473.
- 2) **Kitada, S.**, A. Levin, M. Hiserote, R. J. Harbeck, C. A. Czaja, G. Huitt, S. H. Kasperbauer, and C. L. Daley. 2013. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease in the United States. Eur. Respir. J. 42: 454-460.
- 3) Fukuda, T.\*, Matsumura, T.\*, M. **Ato, M.** Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, **S. Matsumoto, K. Kobayashi,** Kinoshita T, Y.S. Morita (\*T.F. and T.M. contributed equally to this work). 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 4(1):e00472-12.
- 4) Tateishi, Y., **S. Kitada,** K. Miki, **R. Maekura,** Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2012. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. J. Bacteriol. 194: 6336.
- 5) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2012. A novel mechanism

underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J. Biol. Chem. 287: 27743-27752.

- 6) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, **R. Maekura,** Y. Ozeki, H. Ogura, **K. Kobayashi,** Y. Suzuki, and **S. Matsumoto.** 2012. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. PLoS One 7: e42505.
- 7) **松村隆之, 阿戸 学, 小林和夫.** 2012. 解説 . 結核および非結核性抗酸菌感染症の診断 . リウマチ科 47 : 427-435.
- 8) **小林和夫, 松村隆之, 阿戸 学.** 2012. 解説 . 結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題 . JBSA Newsletter 2 (3) : 6-10.
- 9) **Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto.** 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.
- 10) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi,** A. Rambukkana, and **S. Matsumoto.** 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- 11) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Vaccine 29: 6881-6887.
- 12) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi,** H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193: 5766-5774.
- 13) Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, **K. Kobayashi,** and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. J. Biol. Chem. 286: 44153-44161.

### 2. 学会発表

- 1) 佐藤法仁、山崎利雄、**小林和夫**、大原直也 . 2012 . ストレプトマイシン依存性結核菌 18b 株の依存性に関する遺伝子変異の解明と新たなストレプトマイシン耐性を誘導する遺伝子発見の発見 . 結核、87 : 231、2012 . 第 87

- 回日本結核病学会総会（広島、6月）。
- 2) **小林和夫**、光山 正雄．2011．結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）．学術講演要旨 246、2011．第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）。
  - 3) **松本壮吉**、岡 真優子、**北田清悟**、**前倉亮治**、**小林和夫**、2011．結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）．学術講演要旨 246、2011．第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）。
  - 4) **小林和夫**．2011．感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究（Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症）．日臨免誌、34：268、2011．第 39 回日本臨床免疫学会総会（東京、9月）。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

## **Serodiagnosis of active *Mycobacterium avium* complex disease in Taiwan**

**Kazuo KOBAYASHI  
Manabu ATO  
Takayuki MATSUMURA  
Department of Immunology  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan**

**Sohkichi MATSUMOTO  
Department of Bacteriology  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan**

**Ryoji MAEKURA  
Seigo KITADA  
National Hospital Organization Toneyama Hospital, Osaka, Japan**

**Ruwen JOU  
Centers for Disease Control, Taipei, Taiwan**

**Jann-Yuan WANG  
National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan**

Diagnosis of active *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease (MAC-PD) is complicated and time-consuming, because MAC-PD is diagnosed according to the guidelines set forth by the American Thoracic Society 2007, which include clinical and microbiological criteria. A multicenter study from Japan reported the usefulness of a serodiagnostic test to determine serum IgA antibodies against mycobacterial glycopeptidolipid (GPL) core for diagnosing MAC-PD proven by sputum culture (sensitivity: 84%, specificity: 100%) within a few hours. The objective of this study was to evaluate the usefulness of the test in similar patients in Taiwan. Fifty-seven patients with MAC-LD, 11 with MAC contamination, 13 *M. kansasii*-LD, 26 LD due to rapidly-growing mycobacteria (RGM), 48 pulmonary tuberculosis, and 42 household contacts of patients with TB were enrolled into the study at National Taiwan University Hospital. Serum GPL core IgA antibody levels were measured with an enzyme immunoassay kit, and routine clinical evaluations were performed. The sensitivity and specificity (cut off point=0.73 U/mL) of the serodiagnostic test for diagnosing active MAC-PD were 61% and 91%, respectively. The results were lower when compared to previous reports, perhaps due to high proportion of immune-compromized patients in active MAC-PD and RGD-PD patients. We conclude that measurement of serum anti-MAC-GPL IgA level is useful for the diagnosis of MAC-LD in Taiwan.