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
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性の実態調査

分担研究者　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

薬剤耐性結核は結核対策上の脅威となり得る。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疫学調査を実施しており、世界的には日本のナショナルデータとして認識されている。今回、2007 年の第 14 回調査に続いて、第 15 回となる結核菌の薬剤耐性全国調査を実施するため、予備的な調査を含めた準備と研究を行った。

2011 年度現在の結核の疫学的状況から、統計的に必要な患者数（薬剤感受性データ数）を未治療患者 7,339 例、既治療患者 952 例と設定した。試験数が膨大となることから、各施設から結核菌株を収集することは行わず、性別、年齢、登録保健所を含む薬剤感受性試験情報のみを収集するよう計画した。臨床情報の入手については、上記の情報から結核患者登録者情報システム上でマッチングを行うことで厚生労働省健康局結核感染症課と協議し、了承を得ている。

実施可能性の評価のため、2013 年 7 月に予備調査（回答数 104：回答率 73.8%）を行った。研究に参加可能と回答した 67 施設の予想患者数合計 6,244 例となり、この数字を以てしても 1 年では目的数に達しないため、研究は 2 年連続して行うものとした。また 1 回目の予備調査を元に、参加可能と回答した施設に対して、薬剤感受性試験の精度保証の有無を含めた研究参加最終確認を行った。最終的に、62 施設が参加予定となり、予定患者数は 5,775 例となっている。

2014 年 8 月に参加予定の各施設に資料（研究計画書、データ作成法指示書、多剤耐性結核菌分与依頼書、データテンプレート（CD-R）等）を配付し、データ（2012～2013 年の 2 年分のデータ）の収集を開始した。2015 年 3 月末時点で 47 施設（75.8%）からデータの送付を受けている。総データ数は 8,262 で、これは予定データ数の 99.7%に相当するが、今後のデータマッチング過程でロスが発生する可能性を考慮すると、さらに数百株分のデータの追加が望まれる。

＜研究協力者＞
御手洗聡
結核予防会結核研究所抗酸菌部部長
吉山　崇
結核予防会複十字病院診療部付部長

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。

前回の2007年の調査から5年以上が経過（研究開始時点）し、同時に感染症法も施行後5年が経過した。前回の調査ではLVFXの未治療耐性率がINHに匹敵するほど既に高率であることが判明するなど、新たな発見があった一方で、研究参加施設の減少や疫学研究上の倫理指針の取扱など、研究実践上の問題点も数多く指摘されている。特に結核診療施設の集約化で一部の施設に調査上の大きな負担がかかっている。

今回、前回の調査での問題点（三種病原体の輸送、一部施設への過剰な負担、研究倫理、研究期間の長期化、等）を可能な限り回避し、さらに療研調査独自の優位性（感受性試験精度保証）を最大限に生かすよう研究デザインを変更し、第15回となる耐性結核菌全国調査を企画、実施した。

B. 研究方法

I. 目的

1. 総合目標

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

2. 個別目標

a. 研究期間内に分離された結核菌について Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)、Streptomycin (SM)、Levofloxacin (LVFX)の薬剤耐性を調査する。
b. 未治療、既治療患者における薬剤耐性菌の頻度を評価する。
c. 疫学的情報（年齢、性別、地域、合併症）と薬剤耐性との関連を解析する。
d. 多剤耐性結核菌について、二次抗結核薬（ETH、KM、PAS、CS）、LVFX、Pyrazinamide (PZA)等の薬剤感受性試験を実施する。
e. 多剤耐性結核菌について VNTR 等の遺伝子タイピングと系統解析を行う。

II. 方法：

1. 調査対象

研究期間内の全ての結核菌培養陽性症例

2. 調査対象期間

研究期間（情報収集対象期間）は2012年1月～2013年12月とする。

3. 調査対象数

2007～2008年に実施した第14回の療研調査からRFPの耐性率を未治療患者に於いて0.7%、既治療患者で6.7%とし、以下の式より必要数を算出する。

n = (N*z^2*p*(1-p))/(d^2*(N-1)+ z^2*p*(1-p))

N: 全結核菌陽性患者数, z: z-value（信頼度95%として1.96）, d: absolute precision (not more than 20% of p value), p: 期待されるRFP耐性率

（参照 : Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis － 4th ed. WHO/HTM/ TB/2009.422）

2011年の結核統計から結核菌陽性患者数（総数：14,425, 新規罹患数：13,074, 再治療者数：1,351）を各Nとして、新規患者における p=0.007、d=0.0014、既治療患者での p=0.067、d=0.01 (1%) と設定すると、未治療患者での必要数は n=6,672 となる。同様に、既治療患者での必要数は n=865 となる。やはり2011年の罹患数から地域毎の予定必要数を表1（別紙）の様に設定した。

4. 調査方法

今回の耐性調査では、基本的に結核菌を分離株として収集しない。感受性試験に関する精度保証を行っていることを前提として、対象薬剤の感受性試験結果のみを収集し、解析する。

ただし、多剤耐性結核菌のみは二次抗結核薬感受性試験のため最終段階で輸送・収集する。そのため、多剤耐性結核菌が分離された場合は、各施設にて収集まで保管する。

a) 結核菌の薬剤感受性試験結果

INH、RFP、SM、EB について、各施設（外注を含む）で実施している感受性試験方法とともに、試験結果を耐性（R）あるいは感受性（S）の二つのカテゴリーデータとして調査票（スプレッドシート）に記入する。LVFX については実施している場合のみ記入する。

データの精度保証上の要件として、3年以内に薬剤感受性試験に関する精度保証（外部精度評価）

を実施し、これに合格していることとする。外注データを利用する場合は、外注先の施設（検査センター等）が同様の精度評価基準に達していることを前提とする。基本的に耐性既知の結核菌 10株を使用したパネルテストを実施する。合格基準は、INH と RFP に対する感度・特異度が 95%以上であり、対象となる主要4薬剤（INH, RFP, SM, EB）全てで一致率が 90%以上であることとする。

※パネルテスト実施方法

＜目的＞

パネルテスト（感受性結果既知の結核菌株による試験）により、結核菌の薬剤感受性試験精度を評価する。

＜参加要件＞

感染症法の要求する施設基準を満たして結核菌薬剤感受性試験を実施していること

＜送付する検体（結核菌株）＞

結核菌 10 株を 0.5ml の液体培地中に懸濁した状態で送付する。今回送付する菌株は Supra-national Reference Laboratory Network（SRLN）で実施された薬剤感受性検査外部精度評価プログラムにおいて、基本的に施設間で 80%以上の判定一致率を示した菌株であり、その一致した評価を感受性・耐性の基準とする。

感染症法の規定により多剤耐性結核菌の運搬が極めて困難であるため、被検菌に多剤耐性結核菌株を使用しない。しかしながら、他の耐性は存在するため、取り扱いには十分なる注意を要する。なお、被験菌は国連容器を用いて三重包装とし、ゆうパックの規定により四次容器に入れて送付する。四次容器は結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科へ返送とする。

＜試験薬剤＞

検査薬剤は、結果の安定性を考慮して Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)および Streptomycin (SM)とする。

＜感受性検査方法＞

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性検査を行う。調査用紙（エクセルファイル）に感受性検査に関するいくつかの事項を記入し、検査結果とともにコーディネーター（結核研究所・御手洗聡）宛電子メールにて報告する。

連絡先：
御手洗　聡（みたらい　さとし）
結核予防会結核研究所抗酸菌部
E-mail: mitarai@jata.or.jp

＜結果の返送＞

薬剤感受性試験結果のコーディネーターへの報告は被験菌受領から 3 ヶ月以内とする。やむを得ず 3 ヶ月を越える場合には前以てコーディネーターへ連絡する。

＜結果の評価＞

それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定する。尚、報告用紙に記入する際は、感受性には S、耐性には R を用いて表記する。

MIC を用いて検査を行っている施設について、I と判定された場合は R か S かのどちらか各施設にて判定する。さらに測定した MIC の値を併記する。

複数の方法について評価を希望する場合は、それぞれの結果を別々の用紙に記載する。

＜結果の解析＞

データについては「感度」、「特異度」、「耐性的中率」、「感受性的中率」、「一致率」及び「κ 指数」を計算し評価する。ここで感度とは、SRLN で耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様に SRLN で感受性とした株を正しく感受性と判定する割合である。耐性的中率とはある菌株を「耐性」と判定した時、その判定が正解である確率であり、同様に感受性的中率とはある菌株を「感受性」とした時の正解率である。一致率は SRLN との判定の一致の割合を示す。解析結果については個々の解析が終了した時点（結果報告直後）で各施設に個別に通知する。

＜評価の基準＞

INH 及び RFP の両方の薬剤について感度及び特異度が 95%以上であること、また全ての薬剤について一致率が 90%以上であることを到達基準とする。

＜経費＞

各施設での薬剤感受性検査と結果の送付に掛かる費用は各施設の負担とする。

＜被検菌の処理＞

被検菌については、各施設にて検査終了後滅菌廃棄すること。

＜実施責任者＞
検体の送付やデータの取りまとめ・解析は結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科・御手洗聡（療研細菌科会）が行う。

b) 患者情報

結核菌を分離した患者の臨床的情報は本調査の最も重要な因子の一つである。従来の療研調査では各参加施設に於いて全ての臨床情報を入力して頂いたが、この点が臨床現場において多大な負担となっていることから、今回の調査では結核登録者情報を利用することとする。

b-1. 参加施設からの患者情報

結核菌を分離した患者を登録者情報にて同定できるよう、また各施設にて個人情報保護に問題が発生しない範囲を想定し、各施設で感受性試験結果と併せて以下をスプレッドシートに記入する。

① 性別：男性あるいは女性
② 生年月日：M or T or S or H 年/月/日
③ 登録保健所名

b-2. 結核登録者情報からの患者情報

b-1 の情報を元に、厚生労働省健康局結核感染症課の承認のもとに、結核登録者情報システムからのデータの提供（2011、2012、2013 年度分）を依頼する。上記 b-1 の情報から登録保健所で患者を同定し、基本的に以下の情報を抽出する。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する。

① 医療機関名称
② 診断名：肺結核及び肺外結核
③ 国籍
④ 国名
⑤ 職業区分
⑥ X 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

研究参加施設から登録された患者情報を収集し、結核研究所にて解析する。

c) 多剤耐性結核菌

多剤耐性結核菌と同定された菌株については、データ収集期間終了後にまとめて各施設に分与を依頼する。輸送手配は結核研究所抗酸菌部・御手洗聡が各施設の担当者と直接連絡し、基本的に専門輸送業者（日本通運航空部）を利用して感染症法に則って実施する。

なお、感染症法上、譲渡を前提とした一時的保管には三種病原体等取扱基準は適用されない。基本的に施錠された管理区域内に於いて施錠された保管庫において保存しておくことができる。

収集した多剤耐性結核菌については、標準比率法に従って Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Rifabutin (RBT)、Ethambutol (EB)、Streptomycin (SM)、Ethionamide (TH)、Kanamycin (KM)、Para-aminosalycylate (PAS)、Cycloserine (CS)、Pyrazinamide (PZA)、Levofloxacin (LVFX)の薬剤耐性を調査する。また、Supply 24（領域追加の可能性あり）に基づく VNTR により分子疫学的解析を実施する。

5. 倫理上の配慮

疫学研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省：平成 14 年 6 月 17 日　平成 20 年 12 月 1 日一部改正）の基本的な考え方によれば、その適用範囲は「人の疾病の成因及び病態の解明並びに予防及び治療の方法の確立を目的とする疫学研究」である。しかし以下の研究はこの指針の対象とならないとしている。

A) 法律の規定に基づき実施される調査
B) 資料として既に連結不可能匿名化されている情報のみを用いる研究
C) 手術、投薬等の医療行為を伴う介入研究

今回の研究手法は、結核研究所にデータを集積する時点で資料として連結不能・匿名化されている情報のみ（対応表を作成しない）となる。また、収集する情報も個人を特定できないため、個人情報にはあたらないと考えられる。しかしながら上記 A～C のいずれにも該当しないため、基本的には倫理審査と研究対象者の同意（インフォームド・コンセント）を必要とすると考えられるが、当該指針には同時にインフォームド・コンセント

等の簡略化あるいは免除に関する以下の様な記載がある。

① 当該疫学研究が、研究対象者に対して最小限の危険を超える危険を含まないこと。

② 当該方法によることが、研究対象者の不利益とならないこと。

③ 当該方法によらなければ、実際上、当該疫学研究を実施できず、又は当該疫学研究の価値を著しく損ねること。

④ 適切な場合には、常に、次のいずれかの措置が講じられること。

(ア) 研究対象者が含まれる集団に対し、資料の収集・利用の内容を、その方法も含めて広報すること。

(イ) できるだけ早い時期に、研究対象者に事後的説明（集団に対するものも可）を与えること。

(ウ) 長期間にわたって継続的に資料が収集又は利用される場合には、社会に、その実情を、資料の収集又は利用の方法も含めて広報し、社会へ周知される努力を払うこと。

⑤ 当該疫学研究が社会的に重要性が高いと認められるものであること。

(ア) 今回の研究は日常診療（診断）の一環として実施される薬剤感受性検査の結果を収集・解析するものであり、診療上の不利益を与える可能性はない。患者の多くは研究実施以前に退院していると考えられ、インフォームド・コンセントを得ることは実際上困難である。また研究の内容や収集の方法は施設に於いて広報可能であり、もとより結果は社会的に周知される。当該研究が社会的に重要な情報を提供することは過去の歴史からも明白である。

(イ) 従って、今回の研究方法に関する限り、研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手順は免除されうるものと考えられる。しかしながら、研究の目的を含む研究の実施についての情報を各施設で事前に公開する必要があり、また各研究参加施設に於いて倫理審査委員会にインフォームド・コンセント免除の判断を諮問する必要がある。

6. 予備調査の実施

上記のプロトコールを元に 2013 年中に結核感染症課と協議した結果、結核登録者情報を研究目的に二次使用する条件として、予定されているプロトコールの内容が実践可能であることを事前に担保することが求められた。具体的には、検体数を確保する目的で、①今回のサーベイに参加する施設数、②2013 年中に推定される培養陽性・薬剤感受性試験実施件数、および③薬剤感受性試験の外部精度評価（外注先を含む）の実施と合否、について各参加予定施設に確認する。

C. 結果

2011 年の結核統計から結核菌陽性患者数（総数：14,425，新規罹患数：13,074，再治療者数：1,351）を各 N として、新規患者における p=0.007、d=0.0014、既治療患者での p=0.067、d=0.01 (1%) と設定し、未治療患者での必要数は n=6,672、既治療患者での必要数は n=865 とした。データロスの可能性を考慮して 10%多く必要数を設定したため、最終的なデータ（検体）数は未治療患者 7,339 例、既治療患者 952 例となった。

未治療・既治療患者ともに検体数が多いため、2013 年 7 月に予備調査（回答数 104：回答率 73.8%）を実施した。研究に参加可能と回答した 67 施設の予想患者数合計は 6,244 例となった。結果として、疫学的に十分な症例数ではあるものの、1 年の調査期間では目的数に達しないと判断された。

上記の予備調査の結果を受け、厚生労働省健康局結核感染症課と協議し、今回の調査について登録者情報からの患者情報のマッチングを行うことについて了承を得た。

1 回目の予備調査を元に、参加可能と回答した施設に対して、薬剤感受性試験の精度保証の有無を含めた研究参加最終確認を行った。精度保証は過去三年以内に外部精度評価に合格していることを条件とした。1 回目の調査で参加可能と回答し、2 回目の回答がなかったが精度保証が実施されていることが判明している施設については、参加可能と判断した。1 回目の調査で回答がなかったが、2 回目の調査で参加可能と回答した施設も含めた。最終的に、62 施設が参加予定となり、予

定患者数は5,775例となっている。

上記 62 施設の内、精度保証が行われていない（あるいは外部精度評価に合格していない）施設が20施設あったため、2014年2月中に結核菌10株を用いたパネルテストを実施した。最終的に62施設全てで参加可能と判断した。

2014年8月に参加予定の各施設に資料（研究計画書、データ作成法指示書、多剤耐性結核菌分与依頼書、データテンプレート（CD-R）等）を配付し、データの収集を開始した。当初1年ごとのデータを収集する予定であったが、2012～2013年の2 年分のデータをまとめて収集することに変更した。

2015年3月末時点で47施設（75.8%）からデータの送付を受けている。データ数は 8,262 で、MDR-TBは11施設で52株分与可能との回答を得ている（同時点で2施設から23株のMDR-TBを結核研究所に輸送済）。

D. 考察

2012年から第15回となる療研薬剤耐性結核全国調査を開始した。今回の調査は世界保健機関が発行している「Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, Fourth Edition」に従って統計的に有意なデータ数を確保することを第一とした。日本の薬剤耐性は基本的に低頻度であり、2007 年に実施した療研調査では RFP の新規患者での耐性率がわずか0.7%であったため、信頼性のあるデータを得るためには8,000株を超える結核菌の薬剤感受性情報が必要と判断された。これは一検査室の作業量としては膨大であり、感染症法や疫学倫理の基準に照らしても実施困難であることが予想されたため、精度保証されたデータのみを複数年分収集し、解析する方法が採用された。また、近年の臨床現場の多忙を考慮すると多くの臨床データを全て医療施設から入手することも極めて困難（第 14 回の調査では実際に多くのデータがこの過程で入手できなかった）と考えられたため、基本的に各医療施設から入手する情報を限定した。臨床情報は結核登録者情報システムから入手することとして、結核感染症課とも同意の上研究を開始した。

予備調査等を経て実際にデータ収集を開始したのは2014年であり、現在までに8,262株（症例）分のデータを入手している。マッチングプログラムも作成しており、さらに数百のデータを収集した後マッチングと解析を実施する予定である。

療研調査から得られた耐性結核菌情報は日本のナショナルデータと認識されている。しかしながら、系統的なサンプリング方法を採用していない（施設任意参加方式）ため、データとしての代表性が常に問題視されてきた。第 13 回あるいは第 14 回の調査では地域ごとの罹患率で補正した耐性頻度が補正前のデータとあまり変わらないことからほぼ代表的なデータとされたが、今後結核罹患率や耐性率が減少し続けると信頼性はますます低下する。本邦には精度の高い結核登録者情報システムが存在するのであるから、日本国内で実施される全ての薬剤感受性試験を適切に精度保証し、このシステム上でデータ入力（現在は任意）を確実化すれば適切な耐性サーベイランスシステムとなることは明白である。今後はそのようなサーベイランスシステムが確立されることが望ましいと考える。

E. 結論

第15回となる療研耐性結核全国調査を計画し、実施している。サンプリング方法が系統的でないため代表性に問題がある可能性があるものの、既にほぼ予定数のデータを収集した。今後、結核登録者情報システムからの臨床情報とのマッチングと解析が必要である。

F. 健康危惧情報

本研究においては、実験室内で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

学会発表

1. 御手洗聡，水野和重，近松絹代，青野昭男，山田博之，菅本鉄広，山岸文雄. 第 14 回結核療法研究協議会調査による全国の結核菌薬剤耐性状況（1）結核 2012; 87: 270. 第 87 回日本結核病学会総会　広島　2012 年 5 月 10-11 日

2. 御手洗聡，水野和重，近松絹代，青野昭男，山田博之，菅本鉄広，山岸文雄. 第 14 回結核療法研究協議会調査による全国の結核菌薬剤耐性状況（2）結核 2012; 87: 271. 第 87 回日本結核病学会総会　広島　2012 年 5 月 10-11 日
3. 青野昭男，近松絹代，山田博之，御手洗聡. PZA 薬剤感受性試験法の評価　日本臨床微生物学会雑誌　2012; 22: 142. 第 24 回日本臨床微生物学会総会　横浜　2013 年 2 月 2-3 日
4. 青野昭男，近松絹代，山田博之，菅本鉄広，加藤朋子，御手洗聡. 結核菌に対する各種フルオロキノロン剤の MIC. 結核 2013; 88: 266. 第 88 回日本結核病学会総会　千葉 2013 年 3 月 28-29 日論文発表
5. 近松絹代，青野昭男，山田博之，加藤朋子，御手洗聡. Speed-oligo mycobacteria ver2.における *Mycobacterium* 属の同定の評価. 結核 2014; 89(3): 405. 第 89 回日本結核病学会総会. 岐阜 2014 年 5 月 9-10 日
6. 御手洗聡. 還元発色試薬による抗酸菌の MIC 測定. 日本化学療法学会雑誌 2014; 62 Suppl.A: 387. 第 62 回日本化学療法学会. 福岡 2014 年 6 月 18-20 日
7. 青野昭男，近松絹代，髙木明子，御手洗聡. Pyrazinamide 薬剤感受性試験法の評価. 日本臨床微生物学会雑誌 2015; 25(S1): 221. 第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 東京 2015 年 1 月 31 日–2 月 1 日.

論文発表

1. 森　亨, 御手洗聡, 吉山　崇. 近年の日本における多剤耐性結核患者の特性　結核 2012; 87: 565-575.
2. 近松絹代，青野昭男，山田博之，御手洗聡. GenoType® MTBDR*sl* による結核菌の Fluoroquinolone, Aminoglycoside 及び Ethambutol 感受性検査に関する精度評価　結核 2012; 87: 641-647.
3. Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, Katayama M, Nosaka T, Yamaguchi T. High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Chemother. 2013; 19(6): 1116-25.
4. Mitarai S. Current situation of tuberculosis in Japan and requirement for new vaccine. Vaccine. 2014 Jan; 32(2): 304-305.
5. Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y, Kuse N, Morimoto K, Okumura M, Yoshiyama T, Ogata H, Yoshimori K, Kudoh S, Azuma A, Gemma A, Mitarai S. Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. Tuberculosis (Edinb). 2014 Jan; 94(1): 15-9.
6. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN). Nationwide survey of anti-tuberculosis drug resistance in Japan. Int J Tuber Lung Dis 2015; 19(2): 157-162.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1　2011年の結核罹患数に基づく必要予測数

ブロック	罹患数	比率	必要検体数			
			未治療	未治療+10%	既治療	既治療+10%
北海道・東北	1,652	0.073	486	535	63	69
関東甲信越	8,269	0.365	2,432	2,676	315	347
中部・北陸	3,291	0.145	968	1,065	126	138
近畿	4,852	0.214	1,427	1,570	185	204
中国・四国	1,909	0.084	562	618	73	80
九州	2,708	0.119	797	876	103	114
計	22,681	1	6,672	7,339	865	952

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
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
分担研究報告書

WHO Group 5 drugsの抗結核菌作用

研究分担者　露口一成　NHO 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター　感染症研究部長
研究協力者　岡田全司　NHO 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

研究要旨
イソニアジド（INH）とリファンピシン（RFP）の両薬剤に耐性を示す多剤耐性結核（MDRTB）は難治性であり、新たな治療薬の開発が望まれている。結核治療の基本は多剤併用化学療法であり1剤でも多くの薬剤が使用できることが望ましい。世界保健機関（WHO）の定めた抗結核薬のカテゴリーで、Group 5 薬としていくつかの薬剤が挙げられている。このカテゴリーの薬剤の効果については明らかでなく通常の抗結核薬としては推奨しないとされている。今回、このカテゴリーのうちクラリスロマイシン（CAM）、アモキシシリン/クラブラン酸（AMPC/CVA）、リネゾリド（LZD）、高用量イソニアジド（H-INH）、メロペネム（MEPM）のMDRTBに対する有効性を評価する目的で全国の結核治療機関に対してアンケート調査を行った。11 施設より 38 例の使用症例についての回答を得られた。38 例中、超多剤耐性結核（XDRTB）症例は 16 例（42.1%）であった。薬剤ごとの排菌陰性化率については、LZD は 74.2%（23/31）、CAM は 77.8%（7/9）、AMPC/CVA は 44.4%（4/9）、MEPM は 0%（0/5）、H-INH は 75%（3/4）であった。CAM、H-INH による排菌陰性化例の多くは LZD 併用例であった。副作用については、LZD で骨髄抑制による中止例が 4 例みられた他、肝障害、皮疹などがみられた。今回の検討では、LZD の抗結核薬としての有効性が示唆されたが他の 4 剤については明らかにすることはできなかった。

A.研究目的

イソニアジド（INH）とリファンピシン（RFP）の両薬剤に耐性を示す結核は多剤耐性結核（MDRTB）と定義される。MDRTB の治療はきわめて困難であり新たな治療法の確立が望まれている。最近、デラマニドやベダキリンなど新規抗結核薬の開発が相次いでいるが、結核治療の原則は多剤併用療法であり、新たな耐性誘導を防ぐためにも1剤でも多くの薬剤が使えることが望ましい。世界保健機関（WHO）は、抗結核薬を5つにカテゴリー分けしており、Group 5 としてアモキシシリン/クラブラン酸（AMPC/CVA）、クロファジミン、リネゾリド（LZD）、チアセタゾン、クラリスロマイシン（CAM）、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）、高用量イソニアジド（H-INH）等が挙げられている。これらの薬剤は、その効果についてはエビデンスが乏しく不明確であり、通常の抗結核薬とし

ては推奨しないとされている。今回、これらの薬剤のMDRTBに対する効果について評価する目的で、全国の結核治療機関でアンケート調査を行った。

B.研究方法

全国の結核診療施設にアンケートを送付して、2011年から2014年までの間に、MDRTBに対してCAM、AMPC/CVA、LZD、H-INH、MEPM のいずれかを使用した症例についての調査を行った。調査項目は、対象患者の性別、年齢、基礎疾患の有無、結核菌の薬剤感受性結果、治療内容、外科的治療の有無、治療効果（培養が3回以上陰性となれば排菌陰性化とした）、副作用の有無等である。

（倫理面への配慮）

本研究はアンケート調査による後ろ向き研究であり、NHO近畿中央胸部疾患センターの臨床試験審査委員会の承認を得て行った。

C.研究結果

1) 回答施設

全国の結核診療病院259施設にアンケートを送付し、回答が得られたのは85施設（回答率 32.8%）であり、うち登録症例があった施設は11施設であった。国立病院機構病院52施設では回答が得られたのは24施設（回答率46.2%）で登録症例があったのは10施設であった。その他の207施設では回答が得られたのは61施設（回答率29.5%）で登録症例があったのは1施設のみであった。

2) 登録症例

登録症例は合計38例であり、平均年齢は45.8歳であった。男性20例、女性18例であった。基礎疾患としては、糖尿病が5例、悪性腫瘍が3例、透析を要する慢性腎不全が1例などであった。

3) 薬剤感受性

38例のMDRTB症例のうち、カナマイシン（KM）耐性は16例（42.1%）、レボフロキサシン（LVFX）耐性は28例（73.7%）であった。KM・LVFXにも耐性を示す、いわゆる超多剤耐性結核（XDRTB）症例は16例（42.1%）であった。

4) 副作用

LZD使用例31例中、中止を要した副作用5例（骨髄抑制4例、肝障害1例）、中止を要さなかった副作用1例（不眠1例）であった。CAM使用例9例中、中止を要した副作用2例（皮疹1例、関節痛1例）、中止を要さなかった副作用1例（下痢1例）であった。AMPC/CVA使用例9例中、中止を要した副作用3例（皮疹1例、嘔吐1例、肝障害1例）であった。MEPM使用例5例中、中止を要した副作用1例（肝障害1例）であった。H-INH使用例4例中、中止を要した副作用1例（肝障害1例）であった。

5) 各々の薬剤ごとの排菌陰性化率

a) LZD

LZD投与例31例中排菌陰性化したのは23例（74.2%）であった。XDRTB例は12例、non XDRTB例は19例あり、排菌陰性化したのはそれぞれ10例（83.3%）、13例（68.4%）であった。また、手術例は17例、手術を行わなか

った例は 14 例あり、排菌陰性化したのはそれぞれ 15 例(88.2%)、6 例(42.9%)であり、手術を行った例での排菌陰性化率が高かった。

b) CAM

CAM 投与例 9 例中排菌陰性化したのは 7 例（77.8%）であった。LZD 併用した例が 5 例、しなかった例が 4 例あり、排菌陰性化したのはそれぞれ 5 例（100%）、2 例（50%）であり、LZD 併用例での排菌陰性化率が高かった。

c) AMPC/CVA

AMPC/CVA 投与例 9 例中排菌陰性化したのは 4 例（44.4%）であった。

d) MEPM

MEPM 投与例 5 例中排菌陰性化したのは 0 であった。

e) H-INH

H-INH 投与例 4 例中排菌陰性化したのは 3 例（75%）であった。4 例すべて LZD 併用例であった。

D.考察

WHO は抗結核薬を 5 つにグループ分けしており、Group 1 が INH、RFP、エタンブトール（EB）、ピラジナミド（PZA）等の標準抗結核薬、Group 2 がストレプトマイシンやカナマイシン等の注射薬、Group 3 がフルオロキノロン薬、Group 4 がエチオナミド、サイクロセリン等の二次抗結核薬となっており、今回検討した薬剤は Group 5 として分類されている。Group 5 薬は、その有効性については明確でないため通常は使用するべきではなく、Group 1 から Group 4 までの薬剤が使用できず薬剤数が不足する場合に限って使用するとしている。我々も多剤耐性結核の治療にあたって使用可能薬が乏しい場合に使用を試みてきており、改善を認めた症例も経験している。しかし例数が少なく、その有効性については明確でなかったため、今回全国の施設へのアンケート調査を行って検討を行った。

今回の検討では、LZD は 31 例と多数の症例が集まったが、CAM、AMPC/CVA、MEPM、H-INH はいずれも 10 例以下であった。LZD、CAM、H-INH で比較的良好な排菌陰性化率が得られていた。ただし、CAM と H-INH 投与群で排菌陰性化した例の多くは LZD を併用していた。

Group 5 薬の中でも LZD の有効性については既に多数の報告があり、ほぼ確立しつつあると考えられるが、今回の検討でもそれを裏付ける結果となった。一方、CAM、AMPC/CVA、MEPM、H-INH については、十分な症例数が集まらなかったこともあり、その有効性を示すことはできなかった。抗結核化学療法は、耐性誘導を防ぐために必ず多剤併用を行わなければならないという原則があるため、単剤投与による抗菌力評価が困難である。有効性の評価にあたってはさらに多数例の集積による評価が必要である。

副作用については LZD で中止を要する骨髄抑制が多くみられ注意が必要であると思われた。

E.結論

WHO Group 5 薬のうち、LZD はその有効性が示唆される結果となったが、CAM、AMPC/CVA、MEPM、H-INH の有効性については不明であった。

F.研究発表

１．論文発表

1) Yoshida S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Tomita M, Okada M, Shimada R and Hayashi S. Rapid identification of strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group through erm(41) gene pyrosequencing. Diagn Microbiol Infect Dis 2014 Jul; 79(3): 331-336.
2) Yoshida S, Arikawa K, Tsuyuguchi K, Kurashima A, Harada T, Nagai H, Suzuki K, Iwamoto T and Hayashi S. Investigation of the population structure of *Mycobacterium abscessus* complex strains using 17-locus variable number tandem repeat typing and the further distinction of *Mycobacterium massiliense* hsp65 genotypes. J Med Microbiol 2015; 64(3): 254-261

２．学会発表

1) 露口一成、吉田志緒美、富田元久、鈴木克洋、岡田全司、林清二：当院における多剤耐性結核症例の検討. 第 89 回日本結核病学会総会　2014 年 5 月 9 日、岐阜
2) 露口一成：結核専門病院の立場から 第 88 回日本感染症学会総会シンポジウム 3　忘れてはいけない感染症：結核　2014 年 6 月 18 日、福岡

G.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

３．その他

なし

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

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

研究分担者 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)
研究協力者 土方美奈子(同・病理科長)

研究要旨

マイクロRNAは、近年、様々な疾患で、標的遺伝子のタンパク発現を動的に制御することが知られ、感染免疫病態の指標としても注目されている。結核の感染、発症、治療に関連する宿主応答の個体差に関する適切な指標(バイオマーカー)を見出すために、結核における血液中のマイクロRNAおよび免疫関連遺伝子発現を測定の軸として、宿主免疫応答との関連を検討した。HIV感染のない、喀痰塗抹陽性活動性多剤耐性肺結核患者(約100名)、結核治療歴のない同薬剤感受性肺結核患者(約100名)から得た、治療前と治療開始3ヶ月後の全血液中のマイクロRNAと免疫関連遺伝子発現の解析の結果、治療前でmiR-223とIFNγのmRNA発現が負の相関を示しており、miR-223発現量は3ヶ月後には低下していた。全血中miR-223発現量は、結核病態を反映するマーカーである可能性が示された。

A. 研究目的

マイクロRNA (microRNA, 以下miRNA)は、動植物に存在する、蛋白質をコードしない20塩基長程度の短いRNA (non-coding RNA, 以下ncRNA)で、最新のデータベースmiRBase release 21 (2014年6月公開)では、223の動植物種にわたる28,645エントリー(最終産物としては35,828)のmiRNAが登録されており、そのうち、ヒトのmiRNAデータベースは新しいゲノムアセンブリーのGRCh38にリマップされ、1,881のゲノム領域から転写される前駆体と2,588の成熟miRNAが登録されている(http://www.mirbase.org/)。これよりはるかに多いヒトmiRNAが存在するとの新たな報告もあり(Londin E, *et al.* Proc Natl Acad Sci 10;112(10):E1106-15, 2015)、まだmiRNAの全貌は明らかではない。

miRNAは、ゲノムから前駆体のRNAが転写された後に、プロセシングを受け特異的な蛋白と結合し、成熟したmiRNAとなり、相補的にメッセンジャーRNA(mRNA)の3'非翻訳領域と結合することにより、翻訳阻害やmRNA分解の促進などの機序を介して遺伝子発現調節に関わる。miRNA自体が短いRNAであるが、このmRNAとの相補的な結合において重要なシード配列部分の長さはさらに短く、ひとつのmiRNAがいくつものmRNAの発現調節に関わり、また、ひとつのmRNAがいくつものmiRNAによって発現調節されるという関係にある。

mRNAはひとつひとつそれぞれの蛋白をコードして特異的な機能を有するが、ヒトゲノムの解読によって遺伝子の数は予想されたより少なく、ゲノムの多くの領域は蛋白質をコードする遺伝子領域ではないことが判明し、また、

近年の次世代シークエンサーによるRNA解析の進展により、ncRNAの遺伝子発現調節における重要性が非常に高いことが知られるようになってきた。miRNAは近年様々な疾患との関連が次々に明らかになってきているが、これはmiRNAが遺伝子発現の微調整をする役割を担うために、それぞれの疾患における遺伝子発現制御ネットワークに深く関わることによると考えられる。

結核においても、病原体である結核菌と宿主のヒトの免疫・炎症反応の相互作用で病態が形成され、miRNAがヒトの抗結核免疫や炎症反応の微調整をすることが、病態の違いに関わっている可能性があるのではないかと考えられる。本研究では、ヒトの免疫、炎症反応に関わるmRNA発現とmiRNAを同時解析してその発現量の関連を分析することにより、結核病態に関連する新規マーカーとなるmiRNAを見出すことを目的としている。昨年度までの検討により、潜在結核患者においてhsa-miR-223とインターフェロンγ遺伝子(interferon, gamma: *IFNG*), hsa-miR-421 とインターロイキン2遺伝子(interleukin 2: *IL2*)がそれぞれ負の相関を示すことを明らかにしており、今年度はさらに活動性肺結核患者において、これらのmiRNAと遺伝子の発現の関連を検討した。

B. 研究方法

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と我々は以前より国際共同研究として、日越倫理委員会の承認のもと、多剤耐性結核に関連する宿主要因の特徴を明らかにするための臨床研究を実施中である。薬剤感受性試験で多剤耐性（INH, RFP 耐性）と診断された喀痰塗抹陽性活動性肺結核患者(以下MDR-TB)と非多剤耐性結核患者(以下non-MDR-TB)で、HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外し、研究参加の書面同意を得たもの各群約100名を対象とした。治療開始前と開始後3か月に血液サンプルを収集し、全血にRNA安定化剤を付加して凍結し、当施設に転送して全RNAを抽出後、*IFNG*, *IL2*の発現量について、定量的RT−PCR解析を行なった（TaqMan GeneExpression Assays, Life Technologies)。コントロールとしては、*GAPDH*を用いた。miR-223とmiR-421の定量的RT-PCR解析は、miScript II RT Kit (QIAGEN)を用いてpolyA付加反応と逆転写反応を同時に行った上で、miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)とmiScript Primer Assays (QIAGEN)を用いてリアルタイムPCRを行った。サンプル間の発現量の比較のためのコントロールには、推奨されるコントロールsmall RNAのCq値の検討を行い、健常／疾患、治療前／治療後などで変化のないものをコントロールとして用いた。それぞれのPCR系の増幅については、Tm値の確認を行い、予想されるTm値の範囲からはずれたものについては増幅されていないと判断した。各miRNA相対発現量とmRNA相対発現量を$\Delta\Delta$Ct法により求め、発現量についてSpearmanの順位相関係数を算出した(JMP 9.0.0, SAS institute)。

（倫理面への配慮）

研究計画はベトナム、ファムゴックタック病院、国立国際医療研究センター、および結核予防会結核研究所の倫理審査委員会にて承認されている。今回の報告は、血液中の遺伝子発現解析研究であり、ヒトゲノムを扱う研究ではないが、本研究とは直接関連しない部分には、包括的に遺伝子多型解析を実施する可能性があったため、日本における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚

生労働省、経済産業省）と、ベトナムにおける「生物医学研究に関する倫理審査委員会の組織と運営に関する規則」を遵守して、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施している。

研究参加者については、現地の試料提供施設で説明文書を用い説明し、同意書に署名を求め、インフォームドコンセントを得た。試料提供者の個人情報に関しては、試料提供施設の特定の医師が把握して匿名化され、わが国には記号でのみ送られることとした。各血液試料に記号のついたラベルを貼付した。個人情報と記号を対応させたファイルはファムゴックタック病院の鍵のかかる部屋に保管され、同病院の企画部に所属する医師が個人情報管理者となっている。

C．研究結果

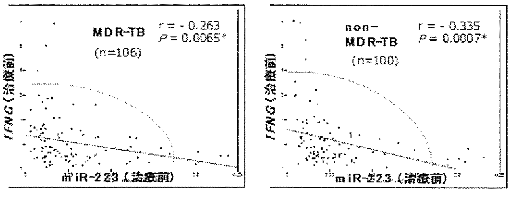
MDR-TB 群、non-MDR-TB 群の、各治療前、治療開始３ヶ月での全血中の *IFNG*, *IL2* mRNA 発現量と miR-223, miR-421 発現量について、順位相関係数を算出した結果、miR-223 と *IFNG* mRNA は治療開始前の MDR-TB 群、non-MDR-TB 群でそれぞれ負の相関がみられたが、３ヶ月では関連が弱く、miR-421 と *IL2* は、non-MDR-TB 群の３ヶ月でのみ弱く負の相関がみられた（表１）。図１に治療前の miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関を示す。

表１

miR-223, miR-421と*IFNG*, *IL2* mRNA発現量の相関

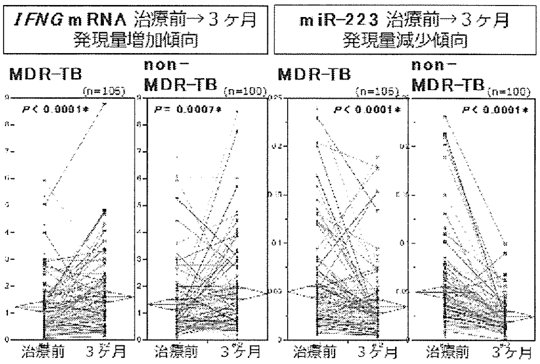
		MDR-TB				non-MDR-TB			
		before Tx		3rd month		before Tx		3rd month	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
IFNG	IL2	[illegible]	[illegible]	0.259	0.0144	0.151	[illegible]	0.255	0.0158
miR-223	***IFNG***	**-0.443**	**<.0001**	0.258	0.0075	**-0.494**	**<.0001**	0.210	0.0350
miR-223	IL2	-0.278	0.0041	-0.009	0.5212	-0.083	0.4189	-0.221	0.0378
miR-421	IFNG	-0.426	<.0001	-0.277	0.0011	-0.357	<.0001	-0.220	0.0276
miR-421	***IL2***	-0.114	0.2469	-0.014	0.8297	0.070	[illegible]	**-0.287**	**0.0047**
miR-223	miR-421	0.748	<.0001	0.493	<.0001	0.625	<.0001	0.436	<.0001

図１　治療前の miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関



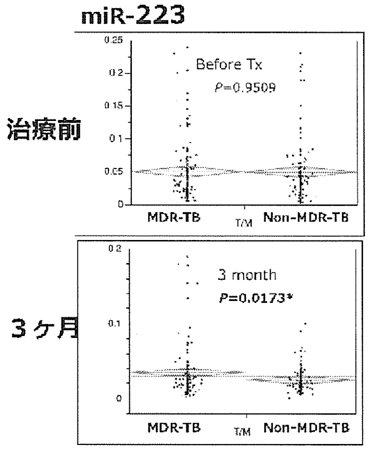
同一患者での治療前から３ヶ月への *IFNG* mRNA と miR-223 の発現量の動きを見ると、MDR-TB 群、non-MDR-TB 群ともに *IFNG* mRNA 発現量は増加傾向にあり、miR-223 発現量は減少傾向にあった(図２)。

図２　治療経過による *IFNG* mRNA と miR-223 の発現量の変化



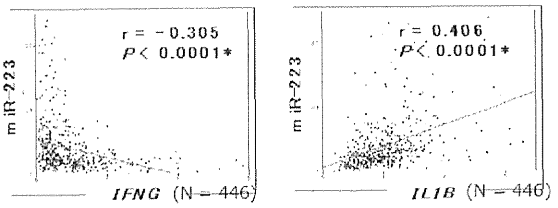
３ヶ月での miR-223 発現量は、多剤耐性結核より薬剤感受性結核で有意に低かった（図３）。

図３　MDR-TB, non-MDR-TB における全血中 miR-223 発現量



miR-223 発現量が、治療開始前～３ヶ月で減少傾向にあるため、炎症が強い状態での発現増加の可能性を考え、全検体につき、miR-223 と *IFNG* と *IL1B* との相関を検討したところ、図４に示すように、miR-223 と *IFNG* 発現量との負の相関とは逆に、miR-223 と *IL1B* は正の相関を示した。

図４　miR-223 と *IFNG, IL1B* mRNA の相関



D．考察

結核菌をはじめとする抗酸菌感染症に対する宿主側の細胞性免疫応答関連分子の中で、Th1 細胞系より産生される IFN-γ はその中心的な役割を担っているサイトカインと考えられている。MDR-TB および non-MDR-TB 患者の治療前全血中において miR-223 発現量が *IFNG* 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と考えられる。

今回、我々の結核患者の全血を用いた検討では、MDR-TB でも non-MDR-TB でも、治療前に miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関がみられ、治療経過に伴い、miR-223 は減少傾向、*IFNG* mRNA は増加傾向がみられ、３ヶ月では負の相関が弱まった。結核治療に伴う３ヶ月での血中の *IFNG* 発現量増加については、同様な観察の報告があり(de Oliveira LR, *et al.* PLoS One. 18:e88572, 2014)、感染病巣に集中していた結核抗原特異的な IFN-γ 産生細胞が血中に戻るためではないかと推測されている。一方、miR-223 は、結核患者での発現増加の報告は複数あり、今回の結果の治療経過による減少傾向と、*IL1B* mRNA との正の相関は、炎症状態による miR-223 の発現増強を示唆するものと考えられる。また、*MIR223* は Xq12 領域に独自のプロモーターを有して存在しており、NF-κB による転写制御の報告もあり(Kumar V, *et al.* Leukemia 28:2324-35, 2014)、炎症誘導性の発現機序があると考えられる。３ヶ月の時点で、MDR-TB の miR-223 発現量が non-MDR-TB より有意に高かったが、これが MDR-TB の治療による炎症状態改善が non-MDR-TB より遅れるためか、あるいは、他の可能性があるのかについて、今後、臨床情報をあわせて解析を行う。治療前の *IFNG* との負の相関が、どのような機序によりみられるのかは、いくつかの可能性があり、同一細胞内での発現制御なのか、exosome による細胞外への分泌を介した遠隔細胞での遺伝子発現制御への影響なのか等も含め、検討が必要である。

miR-223 には様々な機能の報告があり、miR-223 ノックアウトマウス($miR\text{-}223^{-/-}$)における結核では、肺への好中球浸潤が増加して炎症が増悪するとされた(Dorhoi A, *et al.* JCI 123:4836-48, 2013)。しかし、$miR\text{-}223^{-/Y}$ マウスでは、顆粒球系の過剰反応により感染がない状態でも肺の炎症が惹起されるとされており(Johnnidis JB, *et al.* nature 451:1125-9, 2008)、ノックアウトマウスの結核で観察されたことも、miR-223 が顆粒球の分化や反応性の制御に関わることによる可能性がある。一方、ヒトの単球・マクロファージ系での *IKKα* の直接的な発現抑制による NFκB 制御の報告(Li T, *et al.* Nat Immunol 11:799-805, 2010)、LPS 刺激マウスマクロファージでの *STAT3* を介した IL-6 の発現調

節(Chen Q, et al. PLoS ONE 7:e42971, 2012)などの免疫制御機能も報告されている。しかしながら、このように発現の場所や機能が多岐にわたるだけに、miR-223 の結核病態マーカーとしての意義の解明のためには、今後、全血での発現量が何を反映しているのかを明らかにすることが必要である。現在、治療経過のフォローアップ中であり、排菌停止時期との関連など、臨床データとあわせて解析を行う予定である。

E．結論

活動性肺結核患者(MDR-TB, non-MDR-TB)の治療前の全血中で、miR-223 と *IFNG* mRNA の発現量の負の相関を認めた。細胞性免疫応答に miRNA による制御が関与している可能性があり、病態マーカーとしての意義を確立するため、今後さらに検討を行う。

G．研究発表

1. 論文発表

Hijikata M, Matsushita I, Hang N T, Maeda S, Thuong P H, Tam do B, Shimbo T, Sakurada S, Cuong V C, Lien L T, Keicho N, Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam. Hum Immunol, 2014. 75(8): p. 840-6.

Hang N T, Matsushita I, Shimbo T, Hong L T, Tam D B, Lien L T, Thuong P H, Cuong V C, Hijikata M, Kobayashi N, Sakurada S, Higuchi K, Harada N, Endo H, Keicho N, Association between tuberculosis recurrence and interferon-gamma response during treatment. J Infect, 2014. 69: p. 616-626.

2. 学会発表

慶長直人, 松下育美, Hang N T L, Thuong P H, 櫻田紳策, Cuong V C, Lien LT, 土方美奈子. 潜在性結核感染症における全血中マイクロ RNA と抗結核免疫関連遺伝子発現の関連. 第 59 回日本人類遺伝学会; 船堀, 11 月 19-22 日, 2014

土方美奈子, 松下育美, 慶長直人. ベトナムにおける多剤耐性結核患者の全血中マイクロ RNA と免疫関連遺伝子発現量の関連. 第 90 回日本結核病学会総会; 長崎, 3 月 27-28 日, 2015

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

3. その他

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）
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
分担研究報告書
「小児結核全般の実態調査」
研究分担者　徳永　修　国立病院機構南京都病院　小児科医長

BCG ワクチン接種後コッホ現象診断における QFT-3G 上清中 IP-10 定量測定の有用性に関する検討

研究要旨
BCG ワクチン接種後コッホ現象例を含む、乳幼児結核感染例をより良好な感度で診断することを目的に、結核感染が疑われて QFT-3G が実施された小児 54 例において、QFT-3G 上清中の IP-10 も同時に定量測定し、IP-10 を指標とした結核免疫感染診断法（IP-10 release assay）の有用性評価を試みた。
BCG ワクチン接種後にコッホ現象が疑われ、当院でその感染判断を行った 10 例のうち、ワクチン接種局所の所見及び経過、ツ反結果より“結核感染例”と判断した 5 例で IGRA 陽性を呈した例はなかったが、これら全例が $IP\text{-}10_{TB\text{-}Ag}\text{-}IP\text{-}10_{nil}$ 値は設定した Cut-off 域を超える高い値を示した。接触者健診例においても IGRA 陰性／「IP-10 陽性例」を多数認め、QFT-3G 上清中 IP-10 定量測定を併用することにより、BCG ワクチン接種後コッホ現象例を含む乳幼児結核感染例の診断精度が向上することが期待された。

A.研究目的

BCG ワクチン接種後早期に出現するコッホ現象を確実に把握することは、高い確率で発病に至る乳児期結核感染例を早期に診断し、発病予防を目的とした治療を適用する機会として、また、重症化に至る可能性を有する乳児結核発病例を早期に発見して、有効な治療を適用する機会として、非常に重要である。BCG ワクチン接種後早期の局所所見とその推移に加え、ツベルクリン反応検査（以下、ツ反）や IGRA 結果を総合的に評価して、結核感染の有無を判断するが、局所所見やツ反結果より結核既感染が疑われる例も結核発病が明らかとなった例を除き、その多くは IGRA 陰性例である。平成 17 年 4 月の BCG ワクチン直接接種導入以降、毎年全国で 20 例前後のコッホ現象例が報告されている（即ち、BCG ワクチン接種後早期の局所所見を契機に結核既感染が判明している）が、このうち、結核発病が明らかとなる例は毎年 0～1 例のみである。過去の観察研究に基づいて報告されている乳児期での感染後発病に至る頻度に比してコッホ現象例に占める発病例の割合が非常に少ない印象もあり、「果たして結核既感染例が確実に抽出されているのか？（未発病感染例が過剰に診断されていないか？）」、「未発病感染例を正確に診断できる方策はないのか？」、との課題も指摘されている。

近年、結核感染診断の感度をさらに向上させるために、IGRA に加え、IFN-γ 以外の

biomarker を指標とした結核感染免疫診断を併用することの有用性についても検討が進められているが、このうち単球／マクロファージから放出される chemokine である IP-10（CXCL10）を指標とした感染診断の有用性を示唆する論文も多く報告されている。

今回、我々は BCG ワクチン接種後コッホ現象をより高い感度で診断することも目的に、結核感染が疑われて QFT-3G が実施された小児において、QFT-3G 上清中の IP-10 も同時に定量測定し、小児を対象とした結核感染診断における IP-10 release assay の有用性の評価を試みた。

B.研究方法

2010 年 3 月～2011 年 10 月、2013 年 4 月～2015 年 5 月の間に BCG ワクチン接種後に「コッホ現象」が疑われた例を含め、結核感染診断を目的に当院小児科を受診し、2 種の IGRA を実施した小児の一部（54 例）で、後に QFT-3G 上清中（Nil、Mitogen、TB Ag の 3 種採血管）の IP-10 を ELISA 法にて定量測定し、その反応態度を比較検討した。

尚、対象小児から血液を採取した後、QFT-3G では採血管への分注、培養、血清分離までのステップを、T-SPOT では単核球の分離・洗浄・細胞数調整、プレート内での抗原添加・培養、さらにスポット発色までのステップを当院で実施し、QFT-3G で ELISA 法による IFN-γ 定量測定、T-SPOT で発色スポット数のカウント（スポットリーダーによる）、さらに QFT-3G 上清中の IP-10 定量測定は一般社団法人免疫診断研究所（原田登之先生）において測定を行った。

倫理的配慮

本研究の実施にあたっては国立病院機構南京都病院倫理審査委員会に研究計画書を提出し、その倫理的な課題の有無に関して審査を受け、その実施に関する承認を得た。

C.研究結果

1. 症例グループとその年齢分布

対象例の背景により、以下の 4 グループに分類して検討を行った。

1）結核発病例（4 例）; 菌検査・画像検査所見・結核患者との接触歴などより総合的に結核発病例と診断された例

2）接触者健診・濃厚接触例（22 例）; 同居家族に喀痰塗抹陽性肺結核発症が明らかとなり、接触者健診の対象となった小児例

3）接触者健診・非濃厚接触例（18 例）; 結核患者との接触歴が明らかとなり、健診対象となったが、接触頻度が希薄であった小児例

4）コッホ現象疑い例（10 例）; BCG ワクチン接種後の局所所見よりコッホ現象の可能性が疑われ、結核感染診断検査が実施された小児例

各症例グループの年齢分布は図 1 の通りであった。