

・性別； 男性・女性

・職種

( ) 医師、看護師、その他の医療職(具体的に； \_\_\_\_\_ )

( ) 入院患者(妊産婦)

( ) 入院患者(小児)

( ) 患者家族・見舞い客(具体的に； \_\_\_\_\_ )

( ) 保育士、幼稚園教諭、幼児教室講師(具体的に； \_\_\_\_\_ )

保育園・幼児教室・子育てサークル等の保護者・参加者(具体的に； \_\_\_\_\_ )

その他( \_\_\_\_\_ )

・登録時病型

病型分類； 病側 r・l・b / 病変の性状 0・I型・II型・III型・IV型

病変の拡がり 1・2・3 / 特殊型 H・Pl・Op

気管支結核・喉頭結核等 高感染性が想定される病型の有無 ; あり・なし

「あり」の場合、その病型 ( ) 気管支結核、( ) 喉頭結核

肺外結核の場合、病変部位 ( \_\_\_\_\_ )

・菌検査結果

塗抹 陽性・陰性・

培養 陽性・陰性

核酸増幅検査等所見 陽性・陰性

薬剤感受性結果 全剤感受性・耐性あり(耐性薬剤； \_\_\_\_\_ )

・症状など

発現の有無と発現時期

症状；あり・なし 「あり」の場合、その症状；咳・痰・発熱・その他( \_\_\_\_\_ )

発現時期；( \_\_\_\_\_ )

乳幼児集団との接触時の症状有無；あり・なし

乳幼児集団との接触時、マスク着用の状況；着用していた・着用していなかった・不明

・乳幼児集団との接触状況(場所、広さ、換気状況、接触頻度)

場所(病室、教室等)；( \_\_\_\_\_ )

接触した場所の広さ； 約( \_\_\_\_\_ ) m<sup>2</sup>

換気状況(換気回数等)；( \_\_\_\_\_ )

接触頻度； 回数 ( \_\_\_\_\_ ) 回

それぞれの接触時間 或いは 接触時間合計 ( \_\_\_\_\_ ) 時間

Q3.乳幼児集団を対象とした健診実施内容

・健診対象となった乳幼児の人数；

- BCG 未接種（新生児）（            ）人
- BCG 未接種（乳児）（            ）人
- BCG 未接種（1～2 歳）（        ）人
- BCG 未接種（3～6 歳）（        ）人
- BCG 既接種（0 歳）（        ）人
- BCG 既接種（1～2 歳）（        ）人
- BCG 既接種（3～6 歳）（        ）人

・対象児のグループ分け

BCG 接種歴・年齢・接触時期及び接触頻度などによるグループ分けの実際；企画した健診グループを具体的に記載して下さい

・健診実施時期

患者との接触機会から患者発見までの期間；

（複数回の接触がある場合には①初回接触機会及び②最終接触機会から患者発見までの期間）

- ①（            ）週/ヶ月
- ②（            ）週/ヶ月

患者発見からの初回健診までの期間；（            ）週/ヶ月

複数回実施した場合には2回目以降の時期設定（初回健診からの間隔）；（            ）週/ヶ月

・適用した結核感染診断検査内容

（        ）ツ反、（        ）QFT、（        ）T-SPOT

IGRA を適用した場合はその理由、対象とした年齢

理由；（ \_\_\_\_\_ ）

年齢；（ \_\_\_\_\_ ）

当該 IGRA を選択した理由

（ \_\_\_\_\_ ）

・感染判断／予防的治療適用判断の基準

①BCG 未接種例における感染判断／予防的治療適用判断基準

最終的な感染判断までの期間 (=window period) における LTBI 治療適用； あり・なし  
最終的な感染判断／予防的治療適用判断基準；

ツ反 ( \_\_\_\_\_ )  
IGRA ( \_\_\_\_\_ )  
その他 ( \_\_\_\_\_ )

②BCG 既接種例における感染判断／予防的治療適用判断基準

ツ反 ( \_\_\_\_\_ )  
IGRA ( \_\_\_\_\_ )  
その他 ( \_\_\_\_\_ )

・画像検査適用の基準 及び その内容

画像検査適用の基準

( ) 上記の基準に基づいて既感染例と判断した例  
( ) その他

適用した画像検査の内容

( ) 胸部単純写真  
( ) 胸部 CT (単純のみ)  
( ) 胸部 CT (造影を含む)

感染判断結果により適用内容が異なる場合にはその基準

--

・BCG 未接種例に対する「無差別的」予防的治療 (\*\* ) 適用の実際

(\*\* ) 万が一、感染していた場合、発病のリスクが高いとされる健診対象に対して、最終的な感染判断が可能となる時期

を迎えるまでの間 (=window period)、LTBI 治療を適用する

投与期間 (例えば、「患者との最終接触から 3 ヶ月」まで等)；

( \_\_\_\_\_ )

治療中止判断の時期や中止判断の根拠；

( \_\_\_\_\_ )

中止例に対する事後フォローの有無； あり・なし

「あり」の場合は、その時期とその内容；

( \_\_\_\_\_ )

Q4. 乳幼児集団を対象とした健診結果

・感染・発病例の有無

感染例 ( ) 例

うち、発病が確認された例 ( ) 例

「あり」の場合、患者との接触状況(=どの健診グループに含まれた例か?)

Q5. 他の年齢の接触者集団における感染・発病の拡がり

・健診対象者の状況

対象者の人数 ( ) 人

対象グループ(接触状況や発病リスクによるグループ分けの実際)

・感染・発病例の有無； あり・なし

「あり」の場合

感染例 ( ) 例

うち、発病が確認された例 ( ) 例

どの対象グループに含まれた例か?

「結核集団感染」(\*\*)への進展の有無； あり・なし

(\*\*) 定義；2 家族以上にまたがり、20 人以上に結核を感染させた場合を指す。但し、発病者 1 人を 6 人の感染者に相当するとして感染者数を計算する

Q6. 医療機関での健診実施の場合、保健所と医療機関との連携について

Q7. 結核専門家へのコンサルトの有無 ; あり・なし

「あり」の場合、コンサルトした専門家

(

)

Q8. 健診企画・実施時に苦慮した点

Q9. 「乳幼児集団を対象とした接触者健診事例」に関するご意見

調査対象期間に「乳幼児集団を対象とした接触者健診事例」を経験されなかった保健所も含め、コメント（「乳幼児集団を対象とした接触者健診マニュアル」策定の必要性など）があればご自由に記載して下さい

調査へのご協力、誠に有り難うございました。

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

研究要旨

1. 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

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-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 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。

2. 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—

小児結核症例が特に集積する首都圏及び近畿地区の小児科臨床・保健衛生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・臨床関係者間で共有して今後の対策に活かすことを目的に、首都圏 (第 5 回) 及び近畿地区 (第 12 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 (首都圏 2 症例/近畿 4 症例) からは①子どもたちの周囲で生活する成人に発症した結核発病例 (特に妊産婦・産褥婦結核症例) を早期に診断することの重要性、②感染リスクを理解した慎重な接触者健診と事後フォローの重要性、などの問題点が抽出可能であった。小児結核に対する有効な行政施策を検討するためにも重要な情報の抽出が可能な機会でもあり、今度も継続して開催することが望まれる。

### 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例集積を目的とした調査研究

産科・小児科医療機関、保育施設等で感染性を有する結核患者が発生した後に乳幼児集団を対象として実施された接触者健診事例の頻度、感染源患者の状況、健診の実際（スケジュールや適用された検査内容、感染・予防的治療適用判断の根拠）、BCG 未接種例に対する「無差別的」予防的治療適用の実際（投与期間、治療中止判断の時期やその判断根拠）、感染・発病例の有無等に関する情報を収集し、乳幼児集団を対象とした接触者健診及び事後対応の実際を把握すると共に、乳幼児集団を対象とした接触者健診の計画・実施に際して依拠することが可能な「てびき」作成に向けた基礎的資料とすることを目的に全国の保健所を対象に調査票を配布し、2009～2013年に実施された乳幼児集団を対象とした接触者健診事例の収集を試みた。その結果、67事例に関する情報が報告され、毎年全国において20事例前後の健診が企画・実施されていること、健診対象の特殊性を念頭に慎重な健診の企画・実施、予防的対応、感染判断がなされていること、保育所/幼稚園での接触事例を中心に22事例で乳幼児における感染の拡がり確認されたことなどが明らかとなった。それぞれの保健所において、このような年齢集団を対象とした接触者健診を企画、実施する機会は少なく、また依拠することが可能なレファレンスも乏しいために、健診対象、実施時期、適用する感染診断法の選定、さらに感染判断基準の設定などに苦慮している様子も確認された。

#### 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）  
成田 友代（世田谷区保健所）  
宮川 知士（東京都立小児総合医療センター呼吸器科）  
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）  
金子 忠弘（東京都立小児総合医療センター呼吸器科）  
原 良紀（横浜市大附属病院小児科）  
佐藤 紀子（横浜市旭区福祉保健課）  
柴崎 聡子（川崎市高津区役所保健福祉センター）  
鶴田 悟（神戸市立医療センター中央市民

#### 病院）

錦戸 知喜（大阪府立母子保健総合医療センター呼吸器・アレルギー科）  
小森 友喜（京都第一赤十字病院小児科）  
釣永 友希（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター小児科）  
倉田 哲也（大阪市保健所）  
山羽 亜以子（大阪府茨木保健所）

#### A. 研究目的

##### 1. 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

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。

## 2. 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—

小児結核症例が特に集積している首都圏及び近畿地区において、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。

## 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例集積を目的とした調査研究

産科・小児科医療機関、保育施設等で感染性を有する結核患者が発生した後に乳幼児集団を対象として実施された接触者健診事例の頻度、感染源患者の状況、健診の実際（スケジュールや適用された検査内容、感染・予防的治療適用判断の根拠）、BCG未接種例に対する「無差別的」予防的治療適用の実際（投与期間、治療中止判断の時期やその判断根拠）、感染・発病例の有無等に関する情報を収集し、乳幼児集団を対象とした接触者健診及び事後対応の実際を把握すると共に、乳幼児集団を対象とした接触者健診の計画・実施に際して依拠することが可能な「てびき」作成に向けた基礎的資料とすることを目的に本研究を計画、実施した。

## B. 研究方法

### 1. 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 定量測定の有有用性に関する検討

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。

### 2. 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—

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。

### 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例集積を目的とした調査研究

一次調査；全国の保健所あてに調査票を送付し、2009年1月～2013年12月での産科・小児科医療機関、保育施設等で感染性を有する結核患者が発生したのちに乳幼児集団を対象に実施された接触者健診事例の有無を調査。

二次調査；一次調査で「事例あり」との回



答があった保健所あてに二次調査票を送付し、

①健診実施を企画・実施する契機となった結核患者に関する情報（年齢、性別、職種、登録時病型、菌検査結果、症状発現時期・持続期間、乳幼児集団との接触状況）、②乳幼児集団を対象とした健診実施時期と適用された検査内容（BCG 接種の有無や年齢、結核患者との接触状況等によって分けられたグループ毎での対応方針）、③BCG 未接種例に対する「無差別的」予防的治療適用の実際（投与期間、治療中止判断の時期や判断根拠）、④健診対象となった乳幼児集団における感染・発病例の有無、⑤他の年齢の接触者集団における感染・発病の拡がり、などの項目に関して調査を行った。

### C.研究結果

#### 1. 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 定量測定の有効性に関する検討

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-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値は設定した Cut-off 域を超える高い値を示した。

#### 2. 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—

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（第 5 回）及び近畿地区（第 12 回）で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（首都圏 2 症例、近畿 4 症例）からは①子どもたちの周囲で生活する成人に発症した結核発病例を早期に診断することの重要性、②感染リスクを理解した慎重な接触者健診と事後フォローの重要性、などの問題点が抽出可能であった。

#### 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例集積を目的とした調査研究

2009～2013 年に企画・実施された乳幼児集団を対象とした接触者健診事例 67 例に関する情報が報告され、毎年全国において 20 事例前後の健診が企画・実施されていること、健診対象の特殊性を念頭に慎重な健診の企画・実施、予防的対応、感染判断がなされていること、保育所/幼稚園での接触事例を中心に 22 事例で乳幼児における感染の拡がり確認されたことなどが明らかとなった。それぞれの保健所において、このような年齢集団を対象とした接触者健診を企画、実施する機会は少なく、また依頼することが可能なレファレンスも乏しいために、健診対象、実施時期、適用する感染診断法の選定、さらに感染判断基準の設定などに苦慮している様子も確認された。

## D. 考察

### 1. 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

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-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>ini</sub> 値は Cut-off 域を超える高い値を示したことや接触者健診例で IGRA 陰性・「IP-10 陽性例」を多数認めたことは、IP-10 をマーカーとした結核感染診断法により BCG ワクチン接種後コッホ現象例を含め、小児結核未発病感染例を鋭敏に検出できる可能性が期待される結果であった。

一方で「未発病感染例」(潜在性結核感染例)診断の“Gold standard”は存在しないため、より多数の陽性例を認めた IP-10 release assay が IGRA よりも感度良好に感染例を検出しているか否かを判断することは容易ではない。

今後、感染リスクが極めて低いと想定される陰性コントロールグループを対象とした検討を追加すると共に、結核感染疑い例に対する IGRA 及び IP-10 release assay 適用例をさらに集積し、IGRA 陰性／「IP-10 陽性」例を対象として発病の有無に関する前向き追跡を行うことも必要と考えている。

### 2. 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—

今年度に呈示された症例からも、

①子どもたちの周囲で生活する成人に発症した結核発病例を早期に診断することの重要性

②感染リスクを理解した接触者健診と事後フォローの重要性

などの課題が抽出された。

今後も両地域で小児結核症例検討会の開催を継続し、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し、その診断や治療に関する正しい知識を啓蒙する機会とすると共に、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ことが必要であると考える。

### 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例集積を目的とした調査研究

乳幼児集団を対象とした健診の企画・実施に関する多くの課題も報告された。それぞれの保健所において、このような年齢集団を対象とした接触者健診を企画、実施する機会は少なく、また依拠することが可能なレファレンスも乏しいために、健診対象、実施時期、適用する感染診断法の選定、さらに感染判断基準の設定などに苦慮されていた。接触が判明する結核患者の感染性や接触頻度などは事例によって様々であり、クリアカットな指針を示すことは困難であるが、過去に計画・実施された乳幼児集団を対象とした事例を集積し、健診の企画・実施に際して、特に注意すべき点をまとめることは経験することが少ない事例の共有に繋がり、非常に有益な資料になりうるかと考える。今回、ご協力頂き、報告された事例の中から特に参考となりうる教訓的な事例に関してさらに情報を収集し、事例集の

作成に繋げていきたいと考える。

## E.結論

### 1. 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

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-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 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。

### 2. 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—

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（第 5 回）及び近畿地区（第 12 回）で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（首都圏 2 症例、近畿 4 症例）からは①子どもたちの周囲で生活する成人に発症した結核発病例を早期に診断することの重要性、②感染リスクを理解した慎重な接触者健診と事後フォローの重要性、などの問題点が抽出可能であった。

### 3. 乳幼児集団を対象とした接触者健診事例 集積を目的とした調査研究

2009～2013 年に実施された乳幼児集団を対象とした接触者健診事例の収集を試みた。その結果、67 事例に関する情報が報告され、毎年全国において 20 事例前後の健診が企画・実施されていること、健診対象の特殊性を念頭に慎重な健診の企画・実施、予防的対応、感染判断がなされていること、保育所/幼稚園での接触事例を中心に 22 事例で乳幼児における感染の拡がり確認されたことなどが明らかとなった。それぞれの保健所において、このような年齢集団を対象とした接触者健診を企画、実施する機会は少なく、また依拠することが可能なレファレンスも乏しいために、健診対象、実施時期、適用する感染診断法の選定、さらに感染判断基準の設定などに苦慮している様子も確認された。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

徳永 修、宮野前 健、樋口一恵、原田登

之. 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

結核菌の感染性及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部細菌科  
研究協力者 高木明子 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

研究要旨

患者検体より検出された結核菌に感染性及び病原性があるかを判断する基準のひとつとして、その菌が生菌であるかどうかということが挙げられる。現状として生死菌の鑑別には培養検査が必要であり、死菌（陰性）判定までに6～8週間を要する。汎用されている迅速な結核菌検出法として核酸増幅法があり数時間で結果を得られるが、死菌も検出するため感染性及び病原性を評価することはできない。結核患者の入院期間、及び治療効果判定の短縮化のため、生死菌鑑別を迅速に行う手法の開発は重要である。

一般細菌においては、Propidium monoazide (PMA)が死菌の核酸増幅反応を抑制する性質を利用し生死菌鑑別に利用されており、一昨年よりこれを結核菌に応用し検討を行ってきた。今年度はまず培養菌で、確立されたPMA-qPCR法を用いた薬剤感受性試験の検討を行った。定量された生菌数の経時変化から培養4～7日目感受性判定が可能であることが示唆された。しかしながら実験を重ねる上で、生菌率が300%を超える検体があるなど結果が不安定であることが判明した。

これまで培養液中の生菌率の評価にはAuramine O-CTC染色法による呼吸活性評価との比較を行っていたが、この方法では対数増殖期の生菌でも生菌率が10～50%と低く、チール・ネールゼン染色及び培養法からは60～100%とより高い生菌率を得た。昨年までのPMA-qPCR法では対数増殖期の生菌でも生菌率は50%前後であった為、実際の生菌率よりも低い評価となっていた可能性が示唆された。光照射方法をハロゲンランプからLED照射に変えて検討した結果、EMA (Ethidium monoazide) - qPCR法の方がより生菌率を正確に評価できる可能性が示された。

<研究協力者>

加藤朋子、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

A. 研究目的

結核患者の入院基準は感染症法にてその感染性及び病原性の問題から明確に定められており、特に治療開始後の排菌（塗抹）陽性患者は

迅速に感染性があるか（生菌かどうか）評価が出来ない為、培養結果陰性であることを6～8週間待つ必要が生じる場合がある。迅速な結核菌検出法としては核酸増幅法が広く用いられているが、死菌も検出する為原則的に治療開始後の評価には使用できない。結核菌の生死菌鑑別を迅速に評価することができれば、結核患者の入院期間短縮に繋がる可能性があり、また現行

の薬剤感受性試験よりも迅速に感受性の評価ができる可能性がある。

一般細菌では、細胞壁が脆弱な死菌に入り込み DNA 二本鎖に結合し、光照射により DNA が架橋形成され PCR による核酸増幅反応を阻害する propidium monoazide (PMA) あるいは、ethidium monoazide (EMA) を用い、生菌のみを定量 PCR 法で検出する方法が開発されている。これを結核菌に応用した。

昨年度までに、PMA-qPCR 系を用いた培養液中の結核菌の生死菌鑑別法を確立し、対数増殖期の生菌において、Auramine O-CTC 染色法による呼吸活性評価による生菌率と一致することを示した。また培養菌において、菌濃度 ( $10^3 \sim 10^8$  cfu/mL) に関係なく PMA が作用することを示したが、核酸増幅抑制効果が一定しない現象も観察された。予備的に臨床検体 (喀痰) を用いて評価を行い、一定濃度以上の検体であれば喀痰でも PMA-qPCR 系が応用可能であることを示した。

今年度は PMA-qPCR 系が薬剤感受性試験に応用可能であるかを検討した上で、生菌率の評価法を再検討しより正確な生菌率を判定できるように実験系の見直しを行った。

## B. 方法

【PMA-qPCR 法を用いた薬剤感受性試験の迅速化についての検討 (昨年までの条件下)】

<菌液の調製>

*M. tuberculosis* 基準株 (H37Rv) 及び多剤耐性である臨床分離株 (B18-304) を Middlebrook 7H9 培地 5mL に接種し  $OD_{530} = 0.05$  に調整、径 18mm のスクリーキャップ付試験管で 37°C にて  $OD_{530} = 0.17$  になるまで培養した。7H9 培地 4.8mL に前記の菌液 100 $\mu$ L、薬剤投与群には INH (5 $\mu$ g/mL) または RFP (50 $\mu$ g/mL) を最終濃度がそれぞれ 0.1 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL になるように 100 $\mu$ L ずつ添加し計 5mL とした。培養開始 0 日

目、2 日目、4 日目、7 日目に培養液を採取し、PMA を用いた TaqMan MTB (Roche Diagnostics) による生菌数の定量を行った。なお 2 回目の実験については、臨床分離株 4 株 (感受性菌; Lv-55、Lv-56 の 2 株、多剤耐性菌; B17-031、D15-209 の 2 株) を用いて、上記と同様に菌液を調整した。

<ハロゲンランプを使用した PMA-qPCR 系による生菌数の定量>

その特性より、PMA 添加検体の定量は生菌数を示し、無添加検体の定量は全菌数を示す。100  $\mu$ L の菌液を 1 検体 (n=3) 当たり 1.5mL チューブ 6 本に分注し、遠心 (14000rpm、5 分) し、上清を捨て PB 100 $\mu$ L で菌を再懸濁した。用意した菌液のうち 3 本に終濃度 100 $\mu$ M となるように 2mM の PMA 5 $\mu$ L 添加した。暗所、室温にて 5 分間インキュベート後、氷上に検体を置きハロゲンランプ (600W) を 20 cm の距離から 1 分間照射後、菌液を遠心し、PB 100 $\mu$ L で洗浄した。再度遠心し上清を除去し、アンプリコア 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) を用いてマニュアルに沿って処理を行い 200  $\mu$ L の DNA 溶液を抽出した。

検査室で汎用されているリアルタイム PCR システム (Roche/コバス TaqMan48) にて、コバス TaqMan MTB (Roche/#490249) を用いて遺伝子量の定量を行った。この結核菌検出試薬は定性試薬であるが、陽性コントロールが 20 copy/reaction であることを用いて、陽性コントロールと検体の Ct 値の差から検体の DNA copy 数を算出した (このシステムを用いた結核菌の定量性については昨年までに当研究で実証している)。結果の有意性の評価は、Dunnett's 検定を用いて行った。

#### 【生菌率の評価法の検討】

##### <対数増殖期の菌液の調製>

*M. tuberculosis* 基準株 (H37Rv) を Middlebrook 7H9 培地 5mL に接種し  $OD_{530} = 0.05$  に調整、径 18mm のスクリーキャップ付試験管で 37°C にて  $OD_{530} = 0.20$  を超えるまで 2 日間培養した。*M. avium subsp. Avium* 基準株 (ATCC25291) も同様に培養した菌液を対数増殖期の菌とした。

##### <Auramine O-CTC 二重染色法>

菌液 200  $\mu$ L を 1.5mL チューブに分注し遠心、PBS 1mL で洗浄後、PBS 200 $\mu$ L にて菌を再懸濁した。CTC 溶液 4 $\mu$ L および Enhancing reagent B 1 $\mu$ L (同仁化学研究所) を添加し 37°C で 30 分間インキュベート後、2  $\mu$ L をスライドガラスに塗抹し自然乾燥した。4%ホルマリンで 5 分間固定し自然乾燥後、Auramine O 染色を行った。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カウントし、生菌率を算出した。

##### <培養法による生菌率の換算>

菌液を PB にて  $10^2 \sim 10^6$  倍に段階希釈し、 $10^2 \sim 10^4$  倍希釈の菌液を各 2 $\mu$ L ずつ特殊印刷スライドガラス (15 穴 3mm、マツナミガラス) 上の穴に滴下し (n=3)、自然乾燥後火炎固定した。Ziehl-Neelsen 染色 (Z-N 法) 後、各穴内の全ての抗酸菌をカウントし全菌数を換算した。生菌数については、 $10^4 \sim 10^6$  倍希釈の菌液 100  $\mu$ L (n = 3) を 7H10 寒天培地に接種した。3 週間後にコロニー数をカウントし菌数を換算した。以上 2 つの方法を合わせて、生菌率を算出した。

#### 【LED 光源を用いた PMA-qPCR 法による生死菌鑑別の検討】

##### <対数増殖期の菌液の調製>

*M. tuberculosis* 基準株 (H37Rv) を Middlebrook 7H9 培地 5mL に接種し  $OD_{530} = 0.04 \sim 0.05$  に調

整、径 18mm のスクリーキャップ付試験管で 37°C にて  $OD_{530} = 0.023 \sim 0.25$  になるまで 2 日間培養した。

##### <全菌数・生菌数の定量及び生菌率の換算方法>

100 倍希釈した菌液を 100 $\mu$ L ずつ分注し、前記の PMA 処理を行った (n=3)。光照射は LED 照射を用いて行い、生菌の LED 照射時間の検討では、PMA 終濃度 100 $\mu$ M 下にて照射時間は 0 分、5 分、10 分、15 分とした。PMA 濃度の検討では、LED 照射 10 分とし、濃度を 0 $\mu$ M、100 $\mu$ M、150 $\mu$ M、200 $\mu$ M で検討した。光反応後は菌液を遠心後、PB1mL で洗浄し、前記の方法で DNA 抽出、菌の定量を行った。

生菌数カウントは 7H10 培地 (n=2~3、 $10^3 \sim 10^5$  倍希釈の菌液 100 $\mu$ L を接種) で、Z-N 染色法による全菌数カウントは、 $10^2 \sim 10^4$  倍希釈の菌液を 2 $\mu$ L 塗抹 (n=3) して行った。

#### 【LED 光源を用いた EMA-qPCR 法による生死菌鑑別の検討】

##### <対数増殖期の菌液の調製>

*M. tuberculosis* 基準株 (H37Rv) を Middlebrook 7H9 培地 5mL に接種し  $OD_{530} = 0.05$  に調整、径 18mm のスクリーキャップ付試験管で 37°C にて  $OD_{530} = 0.021$  になるまで 2 日間培養した。

##### <EMA-qPCR 系と培養法による対数増殖期の生菌の生菌数の定量>

PMA 実験時と同様に 100 倍希釈した菌液を準備した (n=3)。用意した菌液のうち各検体 3 本に終濃度 150 $\mu$ g/mL となるように 5mg/mL EMA 7.5 $\mu$  を添加した。暗所、氷上にて 5 分間インキュベート後、LED 照明にて 5 分間、10 分間照射を行い、適切な照射時間を検討した。照射後は菌液を遠心し、PB1mL で洗浄した。その後前記の方法で DNA 抽出、菌の定量を行った。

生菌数カウントは 7H10 培地 (n=3、 $10^4 \sim 10^6$  倍希釈の菌液 100 $\mu$ L を接種) で、Z-N 染色法による全菌数カウントは、 $10^2 \sim 10^4$  倍希釈の菌液を 2 $\mu$ L 塗抹 (n=3) して行った。

＜殺菌方法の検討及び EMA-qPCR 系による死菌の生菌率の評価＞

生菌と同様に 100 倍希釈 (煮沸処理菌については 10 倍希釈) した菌液を 100 $\mu$ L ずつ、1 検体 (n=1) 当たり 1.5mL チューブ 2 本に準備した。殺菌方法として、煮沸 10 分、過酸化水素処理 20 分 (終濃度 3%、別日に終濃度 15% でも実験を行った)、ホルマリン処理 20 分 (終濃度 5N) を行い、煮沸菌は処理前に一度遠心した検体を、その他の処理法では処理後 PB1mL 添加後遠心し更に洗浄を行ったものを反応に使用した。反応は前記と同様に行い、LED 照射時間は 15 分で行った。反応後、PB1mL 添加し遠心 (13,000g、5 分) し、再度 PB1mL で洗浄した菌を DNA 抽出、菌の定量に用いた。殺菌効果は、7H10 培地 (n=2) に菌液を接種し確認した。

### C. 結果

【PMA-qPCR 法を用いた薬剤感受性試験の迅速化についての検討 (前年度までの条件下)】

前年度までに確立した PMA-qPCR 法を用いて、従来の薬剤感受性試験をより迅速に行えるかを検討した。感受性菌(H37Rv)と INH、RFP 耐性の臨床分離株(B18-304)を INH または RFP 添加培地にて培養開始時、2 日目、4 日目、及び 7 日目の全菌数、生菌数を PMA-qPCR 法にて定量を行い、生菌率を算出し、結果を図 1a~1f に示した。定量全菌数および生菌数は感受性菌のコントロール群 (薬剤添加なし) において継時的に増加したが、薬剤投与群は増加傾向を認めず、7 日目まではほぼ一定の菌数であった。それに対して耐性菌では、薬剤投与群の菌数もコントロール群と同様に継時的に増加した。感受性

菌の生菌数において培養 7 日目では、コントロール群と比較し INH 及び RFP 投与群で Dunnett's 検定にて有意に低い傾向 ( $p < 0.05$ ) を認め、結果より感受性菌であると判断可能であった。また、同生菌率では、RFP 投与群の培養 4 日目及び 7 日目、INH 投与群の培養 7 日目でコントロール群と比較し有意差を認めた。しかしながら耐性菌では、培養 2 日目に一旦薬剤投与群の生菌率が一旦上昇しコントロール群を超えその後低下、コントロール群の生菌率は培養 7 日目に低下し薬剤投与群と同等となり、生菌率からは判定が困難であった。

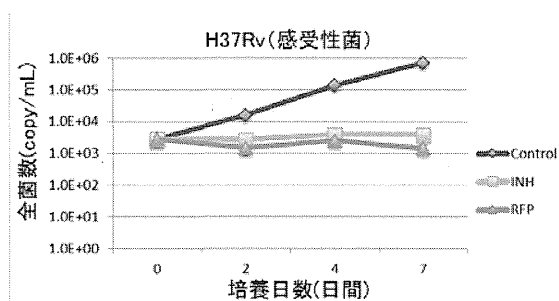


図 1a. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 1 (感受性菌の全菌数) (n=3)

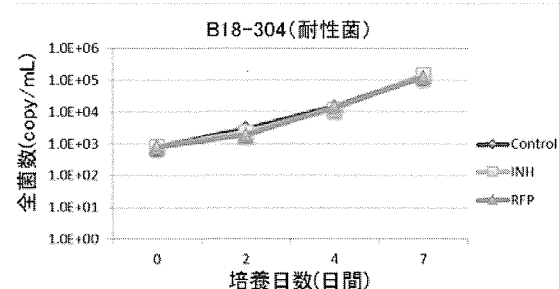


図 1b. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 2 (耐性菌の全菌数) (n=3)



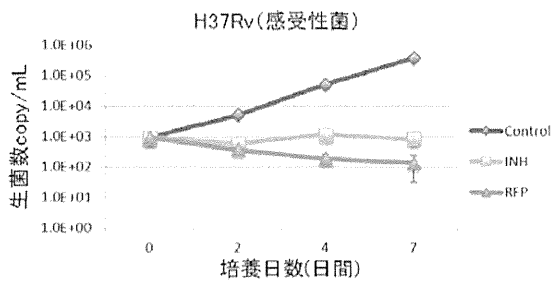


図 1c. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 3 (感受性菌の生菌数) (n=3)

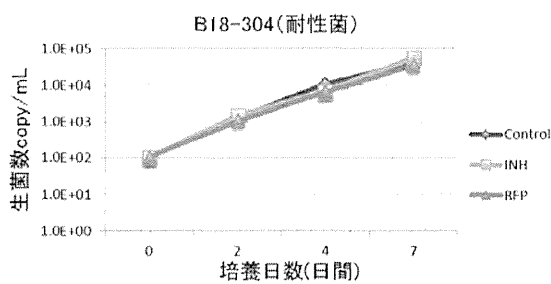


図 1d. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 4 (耐性菌の生菌数) (n=3)

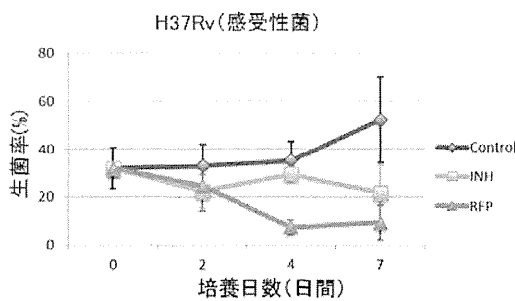


図 1e. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 5 (感受性菌の生菌率) (n=3)

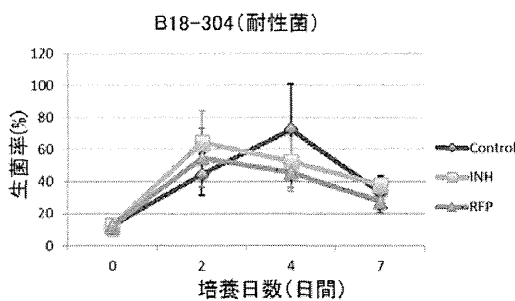


図 1f. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 6 (耐性菌の生菌率) (n=3)

臨床分離株 (感受性菌 2 株、耐性菌 2 株) を用いて再実験を行った結果の一部を図 2 に示した。感受性菌においてコントロール群、及び INH 投与群の生菌率が 200%を超えた検体を認め、一方で RFP 投与群では耐性菌のような経過を示し、生菌率からは感受性判定が困難であった。

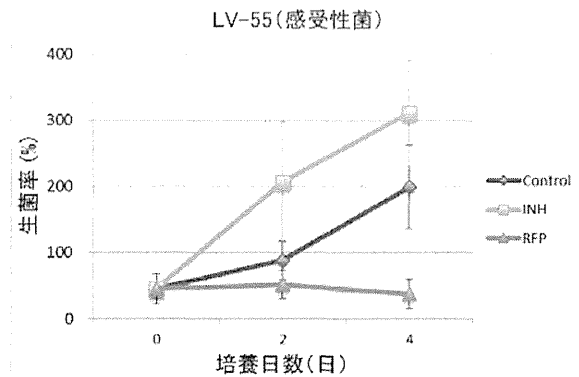


図 2. PMA-qPCR 法による薬剤感受性試験の検討 (2 回目: 感受性菌の生菌率) (n=3)

【生菌率の評価法の検討】

昨年度までに、生死菌鑑別の評価法として 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、この結果と PMA-qPCR 法の生菌率が相関することを示した。この評価法が正しいのかを再検討する目的で、対数増殖期にある培養菌 (H37Rv) を Auramine O-CTC 二重染色法による生菌率と、適度に希釈した 2uL の菌液をチール・ネールゼン染色し全菌数を、7H10 培地を用いた培養法から生菌数を出し生菌率を換算し比較した結果を表 1 に示した。Auramine O-CTC 二重染色法では、生菌率が 10~50%であったが、より正確な生菌率と考えられる培養法では 60~100%となり、より高い生菌率を示した。

検体	1	2	3	4	5
AO-CTC (%)	43	15	30	20	16
ZN+培養 (%)	81	67	75	85	94

表 1. 対数増殖期の培養菌 (H37Rv) の染色法及び培養法で得られた生菌率の比較

対数増殖期の結核菌 (H37Rv) と *M.avium* (MAC) の Auramine O-CTC 二重染色による染色像を図 3a~3b 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を示す (矢印) が、MAC ではほぼ 100%菌が呼吸活性を持つのにに対し、結核菌では染色液の濃度を上げ、染色時間を延ばしても、CTC が染まりにくかった。

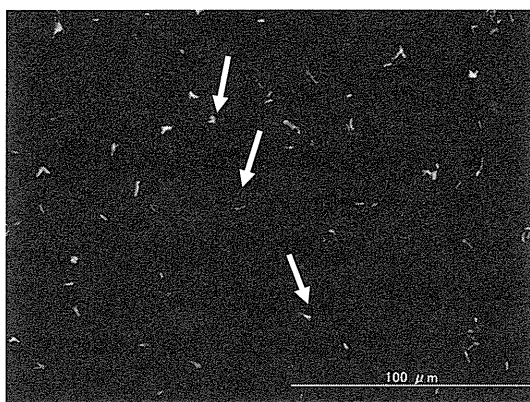


図 3a. 増殖期にある結核菌 (H37Rv) の Auramine O-CTC 二重染色写真

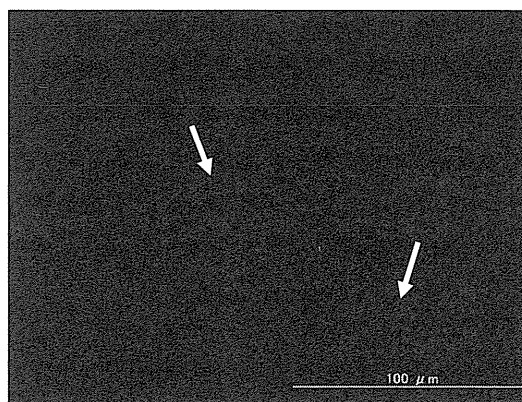


図 3b. 増殖期にある *M.avium* (MAC) の Auramine O-CTC 二重染色写真

#### 【LED 光源を用いた PMA-qPCR 法による生死菌鑑別の検討】

光照射をハロゲンランプから LED 照明に変え、PMA-qPCR 系による生死菌鑑別が安定しより正確な生菌率を提示できるか最適条件を検討した。対数増殖期の培養菌 (H37Rv) を用いて PMA 濃度 100μM 条件下で LED 照射時間を検討した結果を図 4 に示した。LED 照射時間 5~15 分条件下で生菌の割合は 50%前後であった。同時に行ったチール・ネールゼン染色と培養法による生菌の割合は 75%であり、PMA による生菌の遺伝子増幅抑制作用が強く出た結果となった。

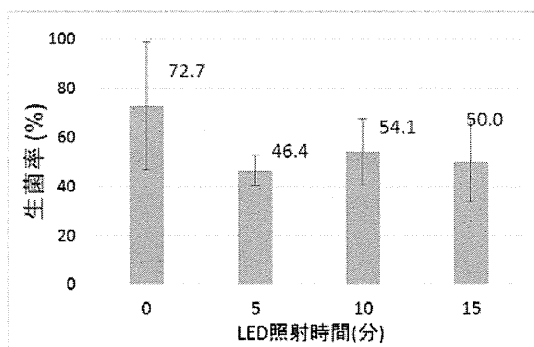


図 4. 対数増殖期の結核菌 (H37Rv) を用いた PMA-qPCR 法による LED 照射時間の違いによる生菌率の検討 (n=3) ~培養法による生菌率は 75%

LED 照射 10 分条件下で PMA 濃度を検討した結果を図 5 に示した。PMA 濃度 100~200 $\mu$ M で定量された生菌の割合は 40~50%であった。同時に行った Z-N 染色と培養法による生菌の割合は 67%であり、こちらも PMA による生菌の遺伝子増幅抑制作用が強くなることが示された。

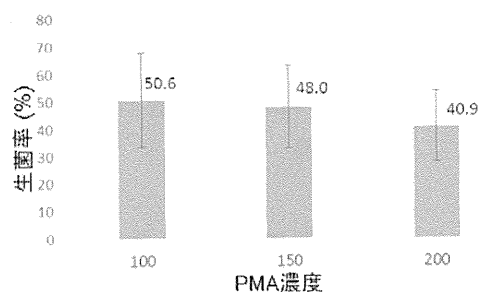


図 5. 対数増殖期の結核菌 (H37Rv) を用いた PMA 濃度の違いによる生菌率の検討 (n=3) ~培養法による生菌率は 67%

#### 【LED 照明を用いた EMA-qPCR 法による生菌鑑別の検討】

EMA を用いた生菌鑑別法において LED 照明にて光照射を行うことで、より正確に結核菌の生菌率を評価できるか検討した。

対数増殖期の菌 (H37Rv) を用いて、EMA150 $\mu$ g/mL 投与下での LED 照射時間を検討した結果を図 6 及び表 2 に示した。LED 照射時間 5~10 分条件下で定量された生菌の割合は 80%前後であった。同時に行ったチール・ネールゼン染色と培養法による生菌の割合は 78.5%であり、EMA-qPCR 法による生菌率と相関を示した。実際に定量された菌量を比較すると、qPCR 法では全菌数、生菌数ともに少ない傾向が見られた。

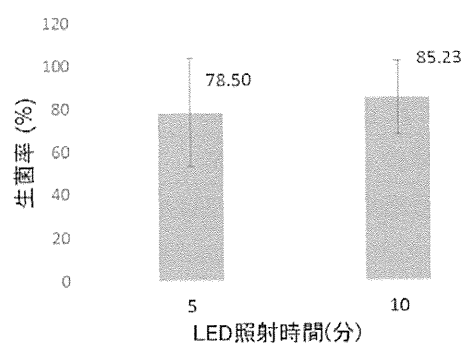


図 6. 対数増殖期の結核菌 (H37Rv) を用いた EMA-qPCR 法における LED 照射時間及び生菌率の検討 (n=3) ~培養法による生菌率は 78.5%

方法	EMA(5)	EMA(10)	Z・培養
全菌数	6.5E+07	4.6E+07	1.04E+08
生菌数	5.1.E+07	3.9.E+07	8.4.E+07

表 2. 対数増殖期の結核菌 (H37Rv) を用いた EMA-qPCR 法と Z-N 法・培養法にて得られた菌数の比較 (n=3)

死菌における EMA の核酸増幅抑制効果及び死菌作成方法を検討した。

3種類の殺菌方法で処理した菌を用いて EMA の効果を検討した結果を図 7 に示した。殺菌方法としては、煮沸 (10 分)、過酸化水素 (終濃度 3%)、ホルマリン (終濃度 5N、20 分) 処理を行った。死菌作成方法として一般的な煮沸法では死菌でも生菌率が 10%であるのに対し、ホルマリン処理菌は 1%と低い値となったが、後日ホルマリン処理菌は接種した培地より生菌が発育し、殺菌処理が十分でないことが判明した。なお過酸化水素処理菌も終濃度 3%で発育が見られ、終濃度 15%に上げると完全に殺菌されるも EMA の効果が低く、定量された生菌数、生菌率は高値のままであった (data not shown)。

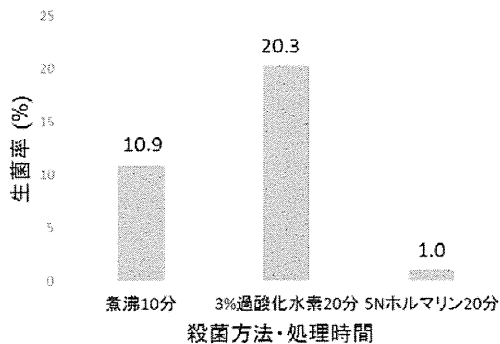


図7. 殺菌方法及び死菌における EMA の核酸増幅抑制効果についての検討 (n=1)

#### D. 考察

昨年度までに PMA を用いた real-time (TaqMan) PCR 定量系 (ハロゲンランプによる光照射) による生菌・死菌判別法の基礎条件を確立した。今年度はこの定量系を薬剤感受性試験に応用し試験の迅速化が可能か、培養菌を用いて検討を行った。生菌数定量の結果から、PMA-qPCR 法を用いることで菌の INH、RFP に対する薬剤感受性が 4～7 日以内に判定できる可能性が示唆された。しかしながら生菌率では判断が難しい例もあり、実験を繰り返すことにより生菌率が 300%を超える検体も認め、結果が安定しなかった。また、これまでの PMA-qPCR 法を用いた定量結果では対数増殖期の結核菌の生菌率が 50%前後であったのに対し、Z-N 染色法による全菌数と 7H10 培地による生菌数から生菌率を換算すると実際の生菌率は 60～100%と換算され、Auramine O-CTC 二重染色の結果 (10～50%) よりも生菌率が高い判定となった。リファレンスとして培養法が適切と思われるが、休眠菌などは Z-N 染色法等で染色されないという報告もある為全菌数を低く定量している可能性も示唆された。なお対数増殖期の MAC の Auramine O-CTC 二重染色ではほぼ 100%の菌が CTC で染色され、結核菌に関しては抗酸菌も含めた他の細菌と異なり CTC に

染まりにくい事が示された。また、一般細菌では休眠菌なども CTC 染色で染まり死菌と判別可能とされているが、結核菌の場合は活動性のある菌以外は染まりにくい可能性もある。

PMA-qPCR 法にて生菌の遺伝子抑制が強い (生菌率の低下) 原因として、これまで光反応に使用していたハロゲンランプが熱を強く発生する為生菌が障害される可能性も考えられた。その為光照射を LED 照射に変えて実験を行ったが、生菌率は 50%前後と低いままであった。ハロゲンランプを用いた定量 PCR 系では EMA の方が PMA よりも生菌の遺伝子増幅抑制が強いという過去の実験結果、報告から PMA を用いていたが、EMA を用いて LED 照射を行い結核菌の生死鑑別をした報告はない為、EMA を用いて実験を行った。EMA-qPCR 系の結果は培養法の生菌率と一致し、より正確に生死菌鑑別ができる可能性が示唆された。また、実際定量された菌数を Z-N 法・培養法と比較すると、全菌数、生菌数ともに少ない傾向が見られたが、これはこれまでの PMA-qPCR 法を用いた定量結果と同様であり、処理の際に数回行う遠心操作の影響が疑われた。PMA-qPCR 系では煮沸処理後の死菌の生菌率が 10～20%と高く判定されたが、EMA-qPCR 法ではホルマリン処理菌の生菌率が 1%とより死菌の核酸増幅が抑えられる定量結果が得られた。残念ながらホルマリン終濃度 5N、20 分処理では完全に殺菌できていなかったが、今後ホルマリン終濃度、作用時間を検討することで死菌作成モデルとしてより適切な殺菌処理法となる可能性も示された。また、煮沸処理の問題点として殺菌処理後の DNA 量が 1/100 と大幅に減少することが挙げられるが、ホルマリン処理後は 1/10 と緩和されており、このことから死菌モデルとして適切であると考えられた。

上記の検討等から EMA-qPCR 法による生死菌鑑別がより正確な生菌率などを反映している