

201420020B

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)

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 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 加 藤 誠 也

平成 27(2015)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…………… 35
2. 新科学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用……………露口 一成…………… 45
岡田 全司…………… 50
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…………… 59
4. 小児結核全般の実態調査……………徳永 修…………… 66
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…………… 107
6. 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた
一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析……………前田 伸司…………… 115
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…………… 126
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…………… 135
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…………… 142
10. 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…………… 177
11. 日本版DOTS の強化・向上……………小林 典子…………… 181
12. 施設内感染対策に関する研究、他……………加藤 誠也…………… 195

III.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	203
IV.	研究成果の刊行物・別冊(一部).....	209

I 総括研究報告書

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)
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

1. 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用：抗結核薬としての有効性が明らかにされていない薬剤の有効性や副作用を評価することを目的に全国の結核診療施設にアンケート調査を行った。リネゾリドの有効性は裏付けられたが、クラリスロマイシン、アモキシシリン/クラブリ酸、メロペネム、高用量イソニアジドについては、十分な症例数が集まらなかったこともあり、有効性を示すことはできなかった。
2. 患者血清中の *granulysin* や *KSP37* 等による慢性排菌や再発の予後診断法開発：結核患者血清中の *granulysin* や *Ksp37* の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に、多剤耐性結核患者の血清中及び患者リンパ球を結核抗原で刺激した培養上清の *granulysin*、*Ksp37* を ELISA 法を用いて測定し、結核重症度、難治性の関連を解析した。多剤耐性等の難治性結核患者では 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、血清中 *granulysin* も健常人に比較し、再発性結核患者で低下していた。これらより慢性排菌や再発の予後診断となり、治療方針の決定に貢献する可能性がある。
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：宿主応答の個体差に関する適切なバイオマーカーを見出すことを目的に、LTBI の有無及び多剤耐性と薬剤感受性結核患者の全血中の特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA の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。LTBI 群では miR-223 と *IFNG* mRNA, miR-421 と *IL2* mRNA がそれぞれ負の相関、また、活動性肺結核患者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。miRNA-223 による抗結核免疫の制御が、特に LTBI における軽微な免疫、炎症応答を修飾している可能性がある。
4. 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：生死菌鑑別を迅速に行う方法を開発することを目的に、市販核酸増幅装置の定量性の検討、至適な PMA・EMA 濃度の設定、ハロゲンランプまたは LED ランプの照射方法・時間の設定、殺菌方法の違い、Auramine O-CTC 二重染色法との比較、PMA-qPCR 系の薬剤感受性試験に応用可能性を検討した。EMA を用いて LED 照射を行いた EMA-qPCR 系の結果は培養法の生菌率と一致し、正確に生死菌鑑別ができる可能性が示唆された。
5. 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析：次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析によって、①感染経路の推定 ②特定株の表現型を既定する責任遺伝子の検索が可能性の検証を目的とした。

①家族内感染事例4株を用いた遺伝系統等の解析及びNGSによるゲノム解析を行い、SNP部位の比較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あることが明らかになった。②広域伝播株であるM株が特異的に持つSNPの中で6種類の遺伝子に注目して、抗酸菌内でのアミノ酸が変化した遺伝子を過剰発現させる実験を行った結果、3種類の遺伝子は形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。

6. 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：大阪湾岸地域においては、多剤・超多剤耐性結核菌のクラスター形成率が高い理由として、補填の変異により生存能力を高めた耐性菌が高率に存在することを示した。地域内感染拡大株のクローン性の高さがゲノム解析により確認され、多剤耐性結核菌が感染拡大するリスクは無視できないことを明らかにした。
7. 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：臨床分離株のゲノムデータを様々な観点から効率的に蓄積し、我が国における結核菌のゲノム多様性解析の基盤を構築することを目的に、1) 国内株の特異性を系統的に網羅するためのゲノムデータ集積、2) VNTR型別一致株(M株)のゲノム解析、3) 低蔓延地域でのクラスター形成株のゲノムデータの比較とそれに基づく検証・分析を行った。これらの結果は、国内株分析の基礎データを構築するとともに、菌株の詳細な異同判定のためのデータ活用パイプラインの構築、伝搬経路推定や分子疫学的展開への応用など、新しい結核対策を指向したゲノムデータの活用を促すものになった。
8. 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連に関する研究：1) 透過型電子顕微鏡による結核菌の超薄連続切片観察からの三次元構築により、直径、菌体長、表面積、体積、リボソーム数を計測した。2) 結核菌及び非結核性抗酸菌株の標本を急速凍結後氷包埋し、Cryo-TEMで観察した。平均菌体直径、細胞質直径は5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。Cryo-透過電子顕微鏡観察値は標準データとしての信頼性が高いと考えられた。3) 改良急速凍結法は培養不能な菌や、その場で処理を行えず輸送が必要な多剤耐性菌の急速凍結法-透過電子顕微鏡標本作製に有用であると考えられた。
9. 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：慢性排菌患者に対する医療として新たな薬の併用療法に関する検討が必要である。第三世代クオん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、発病予測に関連する因子を検討した。フロロスポットを用いた免疫学的検討によって、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。
10. 小児結核全般の実態調査：①QFT-3G及びT-SPOTの小児における診断特性の検討の結果、QFT-3Gでは判定不可が減少し、QFT-3GとT-SPOTの判定結果の乖離は減少したが、乳児未発病感染例での感度不良が示唆された。②QFT-3G上清中IP-10定量測定を併用により、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。③小児結核症例の実態調査により以下が明らかになった：1) 小児結核の大都市への偏在傾向、2) 症例の15%が結核高蔓延国での居住歴を有すること、3) BCG未接種例は全体の10%未満であること、4) 約70%が接触者健診、約25%が有症状受診により診断に至り、約75%でその感染源が同定可能。④全国の保健所に乳幼児集団を対象とした接触者健診事例の調査を行った結果、接触者健診を実施する機会は少なく、対応に苦慮していることが明らかになった。⑤小児科臨床・保健衛生担当者を対象に小児結核症例検討会を実施し、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。

11. DOTS の強化・向上に関する研究：日本版 DOTS の対象拡大に伴い、保健所と結核病棟および外来部門との連携はより重要となっており、これを含めた DOTS の強化・向上を目的に以下について検討・実施した：①結核看護システムを用いた患者の治療継続や効果的な連携，②医療機関における外来での DOTS 実施状況，③喫煙の結核への影響及び禁煙指導，④患者の喫煙・禁煙の課題，⑤結核のリスク評価項目に対する介入，⑥治療成績の自動設定アルゴリズム，⑦「地域 DOTS を円滑に進めるための指針（案）」，⑧DOTS 実施状況の分析に基づく DOTS 実施率の算定式（案）の作成，⑨結核病棟の入院継続困難例の調査，⑩服薬支援看護ワークショップおよび薬局との外来・薬局 DOTS のあり方検討会。
12. 薬剤耐性の実態調査：薬剤耐性の実態調査：前回調査の問題点（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，さらに本調査独自の優位性（感受性試験の精度保証）を最大限に生かすような研究デザインにより調査が開始された。2015 年 3 月末時点で 47 施設（75.8%）から 8,262 データの送付を受けている。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）。しかし，今回においても全国調査としての代表性の疑念は残っており，病原体サーベイランスシステムによる調査が望まれる。
13. 施設内感染対策に関する研究：「結核院内（施設内）感染対策の手引き（平成 26 年版）」を策定し，結核予防会結核研究所のホームページで公開した。刊行物における引用や研修会の資料として広く活用されているが，結核に対する関心が低い施設にどのように周知するかが課題である。
14. 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響：免疫抑制状態にある患者を診療する専門医は，結核発病時の基礎疾患治療の継続，あるいは潜在性結核感染症の発症予防をどのように考えているか把握する目的で調査を実施した。回答された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の知見は未だ定着していないことがうかがえた。また，免疫低下状態の患者の診療を担っている医療施設での結核患者の対応の課題が明らかになった。今後とも，様々な領域の医療者と広く連携し，理解を得られる結核対策を行っていく必要がある。
15. 低まん延化に向けての患者発見対策に関する研究：低まん延化の推進のために重要な意味を持つ患者発見対策について文献的考察を行った。スクリーニングとして定期健診，外国出生者健診，接触者健診，治療終了後の経過観察を患者発見方法として整合性に配慮しながら，強化と効率化の観点から整理する必要がある。定期健診については対象者の絞り込みと受診率の確保，外国出生者に対するスクリーニングの対象・実施時期及び方法の検討，接触者健診については実施状況の評価法の開発とそれに基づく技術支援，医療機関における患者発見は一般の医療機関や国民に対する情報伝達方法の検討，治療終了後の経過観察については再発・発病及び発見率の観点から対象の選定方法の検討が必要と考えられる。
16. インターフェロンγ遊離試験陽性率に関する研究：一般人口における年代別 IGRA 陽性率の推定目的に，接触者健康診断の結果，感染リスクが低かったと思われる集団の IGRA 検査結果のデータを収集し，分析した。一般人口の QFT-3G 陽性率は推定既感染率と比較すると概ね 3-4 割程度で，40 歳代から 70 歳代では年齢と共に上昇したが，80 歳以上では IGRA 陽性率は 70 歳代以上に上昇しなかった。本調査結果は高齢者が多く含まれる接触者健診において，集団感染の有無の判断に有用なデータとなることが期待される。

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 センター長）

露口一成（独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 感染症研究部長）

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）

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、全国薬剤耐性調査、患者発見対策に関する研究、IGRA 陽性率調査から構成されている。

分担研究者の個別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

従来結核に対して使用されることはあったがその有効性が明らかでない薬剤や、新規に認可されわが国では十分な投与経験がない薬剤等について、有効性や副作用を評価することを目的にした。

(2) 患者血清中の Granulysin や KSP37 等に

よる慢性排菌や再発の予後診断法開発

結核患者血清中の granulysin や Ksp37 は結核の重症度につれ低下し、結核免疫に相関することから、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にした。

(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

結核における全血中の 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、結核免疫病態の解明に貢献することを目的とする。

(4) 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方法を開発することを目的とする。

(5) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析

次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析によって、①感染経路の推定の可能性、②特定株の表現型を既定する責任遺伝子の

検索の可能性を検証することを目的とした。

(6) 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

多剤耐性結核菌の市中感染の現状を明らかにし、その背景と感染拡大のリスクを菌のゲノム情報に基づき解析することを目的とした。

(7) 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

臨床分離株のゲノムデータを様々な観点から効率的に蓄積し、我が国における結核菌のゲノム多様性解析の基盤を構築することを目的にした。このため、1) 日本における結核菌系統群の代表株のゲノムデータ集積、2) M株の異同判定と拡散経路の推定、3) 低まん延地域でのクラスター内でのゲノムデータの比較、を実施した。

(8) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連に関する研究

- 1) 超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察：急速凍結置換固定法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察により菌体ごとの類似性、共通性及び多様性の検討を目的にした。
- 2) 固形培地上コロニーのコード形成観察：結核菌と非結核影抗酸菌のコード形成の比較による病原性との関連の検討を目的とした。
- 3) 抗酸菌の氷包埋サンプルの観察：氷包埋サンプルを Cryo-透過電子顕微鏡で観察し、菌種ごとの標準形態の計測による単個菌の形態および病原性とコロニー性状との関連の検討を目的にした。
- 4) サンプル調製法による菌体形態計測値の比較：結核菌のより正確な形態計測データを取得するために最も適した標本調製方法を検討を目的とした。
- 5) 改良急速凍結法の検討を目的とした。

(9) 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治験の検討
- 2) 接触者検診における第三世代クオンティフェロン(QFT-3G)の結果ごとの発病率の算出
- 3) 休眠期の結核感染診断法の開発、を目的とした。

(10) 小児結核全般の実態調査

- 1) 小児を対象とした精度の高い結核感染診断法導入に向けた研究
 - a) QFT-3G 及び T-SPOT TB 反応性の比較
QFT-3G 及び T-SPOT の小児結核感染診断におけるパフォーマンスに関する検討を行う。
 - b) 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
小児を対象とした結核感染診断における IP-10 release assay の有用性の評価を目的とした。
- 2) 小児結核発病例の実態に関する調査研究
小児結核症例の背景要因や診断・治療に関連する課題を明らかにすることを目的にした。
- 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
乳幼児集団を対象とした接触者健診及び事後対応の実態を把握し、乳幼児集団を対象とした接触者健診の「てびき」作成に向けた基礎的資料とすることを目的にした。
- 4) 小児結核に対する関心喚起・知識普及を目的とした研究

発病に至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、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した。

(11) DOTS の強化・向上に関する研究

日本版 DOTS の対象拡大に伴い、保健所と結核病棟および外来部門との連携はより重要となっており、これを含めた DOTS の強化・向上を目的にした。

(12) 薬剤耐性の実態調査

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、第15回調査が開始された。前回の調査での問題点を可能な限り回避し、さらに療研調査独自の優位性を最大限に生かすように研究デザインを変更したもので、進行状況をまとめる。

(13) 施設内感染対策に関する研究

「結核院内（施設内）感染予防の手引き」を策定することを目的とした。

(14) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響

免疫低下状態の患者を診療する専門医が結核感染や発病時の基礎疾患治療の継続、あるいは発症予防のために潜在性結核感染症治療をどのように考えているか、現状を把握することを目的とした。

(15) 低まん延化に向けての患者発見対策に関する研究

定期健診、外国出生者健診、接触者健診、医療機関受診、及び患者管理について治療終了後の再発を患者の発見という観点から検討し、論点の整理を目的とした。

(16) インターフェロン γ 遊離試験陽性率に関する研究

一般人口における高齢者層を含む年代別インターフェロン γ 遊離試験(クオンティフェロン $\text{\textcircled{R}}$ TB ゴールド (QFT-3G)及びTスポット $\text{\textcircled{R}}$ TB (T-SPOT))の陽性率の推定を目的にした。

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

全国の結核診療施設を対象に、平成24年はリファブチン (RBT)、リネゾリド (LZD)、メロペネム (MEPM)、モキシフロキサシン (MFLX)、リファペンチン、平成26年は、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)、LZD、高用量

イソニアジド (H-INH)、MEPM についての使用経験に関するアンケート調査を実施した。

(2) 患者血清中の Granulysin や KSP37 等による慢性排菌や再発の予後診断法開発

多剤耐性結核患者の血清中及び患者リンパ球を結核抗原で刺激した培養上清の granulysin、Ksp37 を ELISA 法を用いて測定し、結核重症度、難治性の関連を解析した。

(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

IFN γ 遊離試験で LTBI の状態を推定した 109 名の医療従事者の全血より total RNA を得て、特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA の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。

(4) 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

一般細菌において Propidium Monoazide (PMA)あるいは Ethidium Monoazide (EMA)が死菌のみ細胞膜を通過し、核酸増幅を抑制する原理の結核菌への応用の可否を検討した。これまでに、市販核酸増幅装置の定量性の検討、至適な PMA・EMA 濃度の設定、ハロゲンランプまたは LED ランプの照射方法・時間の設定、殺菌方法の違い、Auramine O-CTC 二重染色法との比較、PMA-qPCR 系の薬剤感受性試験に応用可能性を検討した。

(5) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析

- 1) 家族内感染事例 4 株を用いて、RFLP, Large sequence polymorphisms (LSP), 遺伝系統解析及び NGS によるゲノム解析を行った。
- 2) いわゆる M 株を用いて、NGS によるゲノム解析を行い、M 株が特異的に持つ 100 箇所以上の SNP を抽出した。これらの SNP の内、アミノ酸変化が伴う非同義置換

SNP を持つ 6 種類の遺伝子に注目して、抗酸菌内での過剰発現実験を行った。

(6) 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) 多剤耐性結核菌及びリファンピシン単独耐性結核菌を解析対象として、①24 領域を用いた VNTR パターンに基づき、minimum spanning tree (MST)を用いて視覚化し、② 薬剤耐性化による生存能力の低下を補填する変異として、*rpoA*、*rpoC* 遺伝子の変異を解読、③ NGS を用いて全ゲノムマッピング解析によって点置換変異を検出した。

2) VNTR 解析により決定した感染拡大株 (L527V 型株) 11 株の全ゲノムマッピング解析を行い、これと直近の共通祖先から分岐したと考えられる株 (G332S 型株と命名) との各株固有の変異を特定した。

(7) 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

NGS により以下のゲノムデータの集積と解析を行った：① 分子系統上の代表的な結核菌株、② 広域的に分離される菌株 (M 株)、③ 低罹患率地域における結核菌サーベイランスでのクラスター形成株

(8) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連に関する研究

1) 透過型電子顕微鏡を用いた結核菌の三次元構築:培養した結核菌株の急速凍結標本を作成し透過電子顕微鏡で観察した。超薄連続切片を作製し、観察に適した 5 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:結核菌及び非結核性抗酸菌標準株の標本を作成し、急速凍結、氷包埋し、Cryo-TEM で観察した。

3) 抗酸菌の氷包埋サンプルの観察:結核菌及び非結核抗酸菌の病原性とコロニー性状

の関連を Cryo 透過電子顕微鏡で観察した。

4) サンプル調製法による菌体形態計測値の比較:同一菌を透過電子顕微鏡及び、走査型電子顕微鏡、Cryo 透過電子顕微鏡で観察し、ソフトウェアを用いて直径、菌体長、aspect ration を計測し、比較した。

5) 改良急速凍結法の検討: glutaraldehyde で予め固定した菌を急速凍結し、透過電子顕微鏡で観察した。

(9) 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) 慢性排菌患者の医療体制: デラマニド及びベダキリンの併用療法について、新たな学会情報等をもとに検討した。

2) QFT-3G の発病率: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) 休眠期の結核感染診断法の開発:新規結核患者、結核治療終了者、潜在性結核感染者、及び健常者の 4 群、各 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 及び MDP1 を用いた。

(10) 小児結核全般の実態調査

1) 小児を対象とした精度の高い結核感染診断法導入に向けた研究

a) QFT-3G 及び T-SPOT TB 反応性の比較

QFT-3G 等の感染診断検査を適用した小児例の背景毎の陽性頻度等について検討を行った。同時期に結核感染診断を目的に QFT-3G 及び T-SPOT を同時に適用した小児例を対象に年齢群毎の QFT-3G 判定不可例の頻度差異及び 2 種の IGRA 検査結果

の一致状況について検討を行った。

- b) コ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
結核感染診断を目的に 2 種の IGRA を実施した小児の QFT-3G 検体上清中の IP-10 を ELISA 法にて定量測定し検討した。

- 2) 小児結核発病例の実態に関する調査研究
2011 年に結核登録者情報システムにおける小児活動性結核症例の登録保健所宛に調査票を送付し、回収可能であった 64 例の調査票内容を集計し、症例背景や診断・治療経過に関する情報の整理・検討を行った。

- 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

全国の保健所を対象に一次調査として、産科・小児科医療機関、保育施設等で乳幼児対象に実施された接触者健診事例の有無を調査し、「事例あり」の施設に二次調査票によって、初発患者、健診時期と検査内容、BCG 未接種例への対応、健診対象集団における感染・発病例の有無等について調査を実施した。

- 4) 小児結核に対する関心喚起・知識普及を目的とした研究

結核発症或いは発症が疑われた小児症例の診断や治療内容、治療支援、症例発見後の事後対応などに課題について、臨床医及び保健所担当者、それぞれの立場から症例の概要及び問題点を呈示し、参加者と共に討議を行った。

- (11) DOTS の強化・向上に関する研究

結核看護システム（以下、本システム）を用いた情報を活用し、以下の検討を行った。

- 1) 患者の治療継続や効果的な連携：本システムにおける新登録患者（潜在性結核感染症治療を含む）2,335 人を対象に、服薬支援状況、リスク評価、服薬支援計画、DOTS パートナー等の項目についてコホート分析を行った。
- 2) 医療機関における外来での DOTS 実施状

況：

全国の結核病床がある 298 病院の結核病棟看護師長宛にアンケート調査を実施した。項目は外来での DOTS 実施の有無、関わっている職員、DOTS の方法、患者教育の方法、連携、DOTS カンファレンスの対象、自由意見等であった。

- 3) 喫煙の結核への影響及び禁煙指導：本システムに入力された治療開始前喫煙状況、喫煙者に対して一日喫煙本数、現在喫煙状況）の情報を分析した。
- 4) 患者の喫煙・禁煙の課題：本システムに入力された患者の治療開始時、治療終了時の喫煙習慣を調べ、これを平成 22 年の一般住民の標本調査成績と比較した。
- 5) 結核のリスク評価項目に対する介入：本システムの登録患者のリスク要因の存否確認の有無、支援方法の検討の有無、介入の結果リスク要因が変容したか、具体的な支援や介入の方法について調査を実施した。
- 6) 治療成績の自動設定アルゴリズム：本システムの判定が「治療成功」の患者と、「脱落」「失敗」等の患者について、その後の治療期間延長や治療成績の変化を観察した。
- 7) 「地域 DOTS を円滑に進めるための指針（案）」の検討：服薬支援看護ワークショップおよび外来・薬局 DOTS のあり方検討会において「地域 DOTS を円滑に進めるための指針（案）」を提示しながら内容の検討を行った。
- 8) DOTS 実施状況の分析に基づく DOTS 実施率の算定式の検討：本システムにおける、DOTS 実施状況の判定期間内の「院内 DOTS・地域 DOTS」の実施割合についてデータを分析し、「実施率」算定方式を検討した。
- 9) 結核病棟の入院継続困難例の調査：結核病床を有する医療機関の結核病棟看護管理者にアンケート調査を実施した。

10) 服薬支援看護ワークショップおよび薬局との外来・薬局 DOTS のあり方検討会：本システムの報告及び「地域 DOTS を円滑に進めるための指針」（案）及び地域連携パスの有用性について検討した。

(12) 薬剤耐性の実態調査

2007～2008 年に実施した第 14 回の療研調査から RFP の耐性率及び 2011 年の結核統計から結核菌陽性患者数から、地域毎の予定必要数を設定した。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（2015 年初頭を予定）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。また、患者情報は保健所の協力を得ながら、結核登録者情報を利用する

(13) 施設内感染対策に関する研究

2000 年に策定された「結核院内感染予防の手引き」を参考に原案を作成し、関係団体等の意見及び、結核対策専門家・保健所医師・結核医療専門家・院内感染対策認定看護師等によるワークショップで内容の検討を行い策定した。

(14) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響

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発送し、回収した。

(15) 低まん延化に向けての患者発見対策に関する研究

法令、予防指針、通知、ガイドラインを踏まえ文献的考察を行った。また、「低まん延化に向けて対策の強化と効率化に関する専門家会議」を開催し、10 名の専門家と意見交換をし、論点をまとめた。

(16) インターフェロン γ 遊離試験陽性率に関

する研究

全国の保健所で過去に実施された接触者健診の中で、結果として感染リスクが低かったと判定される集団における年代毎の IGRA 検査結果及び関連するデータを集計・分析し、一般人口及び医療従事者の IGRA 陽性率の近似値（または参考値）を算出した。

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

LZD は平成 24 年度調査、平成 26 年度調査ともに比較的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 では 2 回の調査ともに良好な排菌陰性化率が得られた。CAM、H-INH でも比較的良好的な排菌陰性化率が得られたが、これらの症例で排菌陰性化した例の多くは LZD を併用していた。RBT については、MDR-TB での有効性は不良であり、有効例では併用薬の影響が否定できないと思われた。

(2) 患者血清中の Granulysin や KSP37 等による慢性排菌や再発の予後診断法開発

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。血清中 granulysin も健常人に比較し、再発性結核患者で低下。

(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

LTBI 群では miR-223 と IFNG mRNA, miR-421 と IL2 mRNA がそれぞれ負の相関を示した。活動性肺結核患者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。同一患者の治療前から 3 か月の間に IFNG と mRNA は増加傾向、miRNA-223 は減少傾向にあり、3 か月での miRNA-223 発現量は多剤耐性結核より感受性結核で優位

に低かった。

(4) 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

培養結核菌及び臨床検体を用いた定量試験から、TaqMan MTB/COBAS TaqMan 48 のシステムには適切な定量性があると考えられた。EMA を用いて LED 照射を行いた EMA-qPCR 系の結果は培養法の生菌率と一致し、Auramine O-CTC 二重染色の結果 (10~50%) よりも正確に生死菌鑑別ができる可能性が示唆された。

(5) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析

①家族内感染の原因菌は RD181 及び RD150 陰性の北京型-modern 株で RD150 領域が欠損したマイナーな系統の株であることが判明した。SNP 部位の比較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った。

②実験した 6 種類の遺伝子の内、3 種類の遺伝子 (*fadD25*, *fadB3*, *kdtB*) は、SNP によりアミノ酸が変化した遺伝子を過剰発現させると形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。

(6) 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

大阪湾岸地域においては、多剤・超多剤耐性結核菌のクラスター形成率が高い要因の一つとして、補填的変異により生存能力を高めた耐性菌が高率に存在することが示された。網羅的な VNTR 解析により、地域内感染拡大株 (補填的変異を有する L527V 型株) が検知され、そのクローン性の高さがゲノム解析により確認された。遺伝子マーカーとして、*intergenic* 領域上の変異 (ゲノム上の 3067988 番目の塩基の T から G への変異) を特定した。

(7) 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

- 1) わが国で見いだされていた全系統のゲノムデータを獲得した。
- 2) M 株の感染の広がりが直近の伝播のみでないことが判明した。M 株に共通な SNP をマーカー用いて抽出した 52 株中 VNTR24 領域が一致したのは 35 株であった。また、M 株は関西圏でのみ見出される 1 系統と、地域に関わらず分離される 2 系統に分類され、それぞれの拡散経緯が異なることが示唆された。
- 3) 低まん延地域のサーベイランスでの 17 クラスター中、共通感染源による事例と考えられたのは 7 クラスターであり、この中の 6 クラスターは保健師らによる患者情報の集積によって集団事例の可能性が把握されていた。また、10 クラスターは菌株間の変異数が多く、直接的な関係は薄いことが示された。
- (8) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連に関する研究
 - 1) 透過型電子顕微鏡を用いた結核菌の三次元構築: 計測した 5 菌体の平均菌体直径、細胞質直径はそれぞれ $0.345 \mu\text{m}$, $0.297 \mu\text{m}$ 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。
 - 2) コード形成と病原性の検討: 抗酸菌コロニー内の菌塊の形態に基づいて 4 群に分けられた。病原性菌と非病原性菌の比較では菌体幅、長さも有意差はなかったが、迅速発育菌と遅発育菌の比較では、遅発育菌の菌体長が有意に長く、*aspect ratio* も遅発育菌が有意に大きかった。
 - 3) 抗酸菌の氷包埋サンプルの観察: 菌体直径は種間での差がほとんどなかったが、菌体長は最短・最長で 2 倍以上の差があった。
 - 4) サンプル調製法による菌体形態計測値の

比較：直径に関しては SEM 観察の値が Cryo-TEM、ネガティブ染色観察の値と比較して有意に小さく、菌体長に関しては Cryo-TEM 観察の値が他の 2 法と比較して有意に長く、SEM 観察値はネガティブ染色法と比較して有意に小さかった。ネガティブ染色と SEM 観察では菌体の収縮が示唆され、Cryo-透過電子顕微鏡観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられた。

5) 改良急速凍結法の検討:改良急速凍結法は従来の方法で作成した標本に匹敵する微細構造の保存が認められた。

(9) 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) 慢性排菌患者の医療体制:デラマニドは承認され、ベダキリンの日本における第三相試験として安全性を確認するための検討が行われることとなった。ただし、デラマニドとベダキリンの併用の可否については、米国 NIH の治験の結果待ちである。

2) QFT-3G の発病率:多変量解析の結果, ① QFT-3G 検査が陽性, ②感染源の感染性(周囲の QFT-3G 陽性者の数)が多い, ③潜在結核感染治療を行わず, ④接触者が医療従事者でない場合に発病の危険が高い, という結果になった。

3) 休眠期の結核感染診断法の開発: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。

(10) 小児結核全般の実態調査

1) 小児を対象とした精度の高い結核感染診断法導入に向けた研究

a) QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

①QFT-2G から QFT-3G 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-3G 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発病例では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コッホ現象と判断した例では発病例を除いて IGRA 陽性例は認めず、乳児未発病感染例における感度不良が示唆された。

b) 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、IP-10TB-Ag-IP-10nil 値は全例で Cut-off 域を超える高い値を示した。

2) 小児結核発病例の実態に関する調査研究
調査によって、①小児結核発病例が大都市部に偏在する傾向、②結核高蔓延国での居住歴を有する小児が全体の約 15%、③BCG 未接種例は全体の 10%未満、④全例の約 70%が接触者健診により、約 25%が有症状受診により診断に至り、約 75%でその感染源が同定可能、等の結果が明らかとなった。

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

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た。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、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。乳幼児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、参考資料も乏しいために、保健所では対応に苦慮している様子も確認された。

4) 小児結核に対する関心喚起・知識普及を目

的とした研究

首都圏及び近畿地区における症例検討会には各々毎回 120 名以上の小児科臨床及び保健関係者が参加し、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。各症例検討会によって、高まん延国での居住歴、外国籍、感染診断、医療提供体制、コッホ現象、正確な画像診断、脆弱な家庭機能とそれに対する支援、薬剤耐性結核、重症結核・結核性髄膜炎、服薬支援、診断の遅れ、患者発生後の疫学調査、学校との連携、妊産婦結核、接触者健診と事後フォローなどの問題点が抽出された。

(11) DOTS の強化・向上に関する研究

1) 結核看護システムを用いた患者の治療継続や効果的な連携：

3 年間の新登録肺結核患者総数 1667 人の判定結果は、「治療成功」76.3%、「死亡」19.5%、「治療失敗」0.8%、「脱落中断」0.7%、「不明」1.7%であった。

2) 医療機関における外来での DOTS 実施状況

医療機関での外来 DOTS の実施状況の調査では、外来 DOTS の実施率は回答施設の 54.8%であった。未実施医療機関からは、保健所と何らかの連携が取れているという回答が多かった。

3) 喫煙の結核への影響及び禁煙指導

治療成績と有意に関連したのは年齢のみで、喫煙関連の要因には有意の関連はみられなかった。

4) 患者の喫煙・禁煙の課題

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。喫煙の結核罹患に対する相対危険度を 2.0 と仮定すると、日本の結核は男性で 19%、女性で 6%、全体で 18%が喫煙による過剰発生になる。さらに罹患率の男女差の 42%が喫煙によって説明される。治療終了時までには 7%が禁煙、14%

は喫煙量を減らしていたが、49%は喫煙していた。

5) 結核のリスク評価項目に対する介入

「リスクの確認あり・支援方法検討なし」の割合が最も多かった項目は「その他の合併症」であった。「介入後リスクの軽減あり」は、「喫煙」が 21.4%で最も低く、禁煙教育に十分踏み込めていないことが明らかとなった。

6) 治療成績の自動設定アルゴリズム

「失敗」後の治療継続例 13 人の失敗の原因は薬剤耐性 5 人、副作用 2 人、その他医師側の理由 1 人、合併症 1 人、不明 2 人で、これらの患者の最終結果は治療成功 11 人、失敗 2 人であった。

7) 「地域 DOTS を円滑に進めるための指針(案)」の検討

服薬支援看護ワークショップおよび「外来・薬局 DOTS のあり方に関する検討会」における検討結果を踏まえて、案を作成し、日本結核病学会エキスパート委員会に提出した。

8) DOTS 実施状況の分析に基づく DOTS 実施率の算定式の検討

本システムによる DOTS 実施状況の分析に基づいて、治療期間中の毎月 1 回以上の服薬確認を『実施(完全実施)』とし、不測の事態等によって実施できない場合を考慮して、治療期間内の 2/3 を超える月数で、月 1 回実施ができていれば『実施(準完全実施)』とすることを提案した。

9) 結核病棟の入院継続困難例の調査

「自己退院・強制退院・精神科等への転院」の理由は、「自己退院」では、入院のストレス・入院拒否が 39.9%、アルコール問題 26.7%、また外国人も含まれていた。「強制退院」では、入院規則違反・無断離院・暴言暴力・窃盗が 87.5%、「転院」15 名では、認知症・精神疾患が 66.6%であった。

10) 服薬支援看護ワークショップおよび薬局

との外来・薬局 DOTS のあり方検討会

地域連携のあり方について意見交換をした。手帳型の地域連携パスは「医師によるコメントの記載や菌検査結果の記入に活用され、医療機関から連絡がもらえる」との意見があった。患者が退院後も同じ医療機関に通院する場合は地域連携パスを用いなくとも、医療機関や薬局等との円滑な連携が行われていた。結核専門病院以外で治療を開始する場合や退院後に一般病院へ転院する場合には連携が図りにくい等、今後の地域連携体制の課題が示された。

(12) 薬剤耐性の実態調査

最終的な検体数は未治療患者 7,339 例、既治療患者 952 例と計算された。精度保証が行われていない施設に対してパネルテストを実施したところ、全 62 施設が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。2015 年 3 月末時点で 47 施設（75.8%）から 8,262 データの送付を受けている。MDR-TB は 11 施設で 52 株の分与が可能との回答を得た（2 施設から 23 株の MDR-TB を結核研究所に輸送済）。

(13) 施設内感染対策に関する研究

「結核院内（施設内）感染対策の手引き平成 26 年版」を策定した。感染発病の基本的な理解から、医療現場等での実際的対応までわかりやすく記述されている。

(14) 結核感染・罹患時の基礎疾患への影響

結核発病によって基礎疾患の治療を中止し再開しない、という施設はほとんどなく、医療の継続が図られていた。結核発病後の入院加療を同施設で行うことが可能な施設 30%程度であった。外来も含め院内で結核診療が全くできないとの回答は少数であった。感染診断法とし

て IGRA について十分な情報の浸透がなされていないと考えられた。「潜在性結核の治療指針」は半数以上が利用していなかった。

(15) 低まん延化に向けての患者発見対策に関する研究

罹患率の低下とともに発見率が低くなり、感染リスクに応じた効率的な健診を行う方向が示され、感染症法による健診、事業所健診、学校の児童・生徒の健診とも対象は縮小となっている。日本では外国出生者であっても出生地を問わずに健診を受ける機会はあるが、外国出生者のみを対象とした健診は制度化されていない。欧米先進国では、実施時、検査法、対象の選定方法など、国・地域によって様々な方法によるスクリーニングが実施されている。接触者健診は患者発見方法として重要性が高いが、地域によって実施状況に差があり、改善を図る必要がある。医療機関における患者発見は 2013 年の新登録患者の 83%を占めており、早期発見のために最も重要であるが、結核に接する機会の少ない一般の医療機関等での診断の遅れは著しくなっている可能性がある。活動性結及び LTBI 治療終了後の再発・発病は一定数発生することは避けられないことから、効率にも配慮しながら検討を行う必要がある。

(16) インターフェロン γ 遊離試験陽性率に関する研究

今回の検討の結果、一般人口の QFT-3G 陽性率は 40 歳代：4.6%、50 歳代：6.1%、60 歳代：9.4%、70 歳代：15.7%と年齢と共に上昇し、推定既感染率と比較すると概ね 3-4 割程度であったが、80 歳以上では IGRA 陽性率は 70 歳代以上に上昇しなかった。T-SPOT は QFT-3G と大きな違いはないと思われるが、80 歳代で 26.3%と比較的高い陽性率を示した。

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

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、RBT 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。

(2) 患者血清中の Granulysin や KSP37 等による慢性排菌や再発の予後診断法開発

結核患者血清中の granulysin や Ksp37 は結核の重症度につれ低下し、結核免疫に相關することから、慢性排菌や再発の予後診断となり、治療方針の決定に献する可能性がある。

(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

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-223 による抗結核免疫の制御が、特に LTBI における軽微な免疫、炎症応答を修飾している可能性がある。今後、このような観点から、新規遺伝子/蛋白発現制御マーカー探索が開発され、結核対策に応用されることが期待される。

(4) 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

これまでの検討により、LED 光源を利用した EMA-qPCR 法による方法がより正確な生菌率などを反映していると考えられた。今後、菌濃度による EMA 効果の検討など基礎的検討を十分行った上で、臨床検体処理の至適条件を検討し、臨床応用していく必要がある。また、

臨床検体の保管可能期間や前処理法に関する検討が不十分であり、これも今後の課題と考えられた。

(5) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較により得られた一塩基多型 (SNP) を利用した結核菌の解析

1) 今回検討した事例では、結核菌の遺伝的進化方向と疫学調査結果に齟齬があり、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だった。この原因として、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關与する、② 体外で浮遊している際に変異が生じる、③ 二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によって、これらのメカニズムが解明されると考えられる。

2) 対象遺伝子は (野生型) プラスミド導入株に比べて M 株の非同義置換 SNP を持つ遺伝子 (変異型) プラスミド導入株のコロニー数が① 多かった遺伝子、② 少なかった遺伝子、③ 変わらなかった遺伝子 (当該遺伝子が關与しなかった) に分類された。①,②は SNP が存在しアミノ酸が変化すると形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。

(6) 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

補填的変異を保有し生存能力を高めた株の存在及び地域内感染拡大株のクローン性の高さがゲノム解析により確認され、多剤・超多剤耐性結核菌が広域に感染拡大するリスクは無視できないことを明らかにした。さらに、今後、L527V 型株を簡便かつ迅速にモニタリングできる変異の特定によって、特定の菌株の広域拡散を監視する体制を構築する上での、貴重な成

功モデルとして、意義深いものといえる。

(7) 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

本研究は国内株分析の基礎データを構築するとともに、菌株の詳細な異同判定のためのデータ活用パイプラインの構築、伝搬経路推定や分子疫学的展開への応用など、新しい結核対策を指向したゲノムデータの活用を促すものとなった。

(8) 結核菌の病原性と形態学的特徴との関連に関する研究

急速凍結法で調製した結核菌超薄連続切片の観察による細菌を対象とした報告はこれまで例がない。実測値を計測し、結核菌の様々な研究領域に有用な基礎データを提供しようと考えられる。平均菌体直径、細胞質直径は菌体による差はほとんど見られなかったが、その他の計測値は差が見られた。

コード形成に関しては、菌体長が結核菌と近似した種のコロニー内の菌の配置は類似している傾向が見られたが、それらの種のコロニーでは単個菌の配置が平面的で、結核菌のコードはより立体的であるように思われた

Cryo-透過電子顕微鏡観察値は標準データとしての信頼性が高いと考えられた。

改良急速凍結法は培養不能な菌や、その場で処理を行えず輸送が必要な多剤耐性菌の急速凍結法-透過電子顕微鏡標本作製に有用であると考えられた。

(9) 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) 慢性排菌患者の医療体制:慢性排菌患者の治療のためには、オキザロリジノン(リネゾリド, ステゾリド, AZD5847 など), ベダキリン, デラマニドまたはプレトマニド, SQ109(まだ第二相治験)の4系統の新薬のうち3剤以上の併用療法が必要と考え

られる。

2) QFT-3Gの発病率: 検討症例数は670例程度に終わっており、特に、陽性で潜在結核感染治療後の症例については100例に満たず詳細な検討ができなかった。

3) 休眠期の結核感染診断法の開発: 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は、従来報告されているようにメモリーT細胞は主にIL-2を産生するという内容を考慮すると、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る。

(10) 小児結核全般の実態調査

1) 小児を対象とした精度の高い結核感染診断法導入に向けた研究

a) QFT-GIT及びT-SPOT TB反応性の比較

①小児を対象とした感染診断にIGRA適用を積極的に適用し、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、②低年齢小児の未発病感染例では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、感染・発病リスク等も勘案した慎重な感染判断を行う必要がある。

b) 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
IP-10をマーカーとした結核感染診断法により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が、症例をさらに集積し、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られる。

2) 小児結核発病例の実態に関する調査研究
調査結果を踏まえ、小児結核をさらに減少させるためには、①当面、高いBCGワクチン接種率を維持する、②大都市部を対象とし

た選択的な対策の継続,③高蔓延国からの転入小児に対する発病スクリーニング検査の適用,④感染・発病リスクが高い環境に生活する子どもたちに対する積極的な支援,⑤小児「結核医療の基準」の呈示,⑥全症例の発症時登録制度と専門医による助言・指導システムの構築が必要と考えられる。

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

乳幼児集団を対象とした事例を集積することによって、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と考える。

4) 小児結核に対する関心喚起・知識普及を目的とした研究

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られる。

(11) DOTS の強化・向上に関する研究

1) 結核看護システムを用いた患者の治療継続や効果的な連携

DOTS カンファレンスやコホート検討会に使用される服薬情報やリスク評価などにより保健所・医療機関による情報および問題の共有や支援の連携を図ることが可能となり、地域連携構築につながっていくものと考えられる。

2) 医療機関における外来での DOTS 実施状況

外来 DOTS の確認や患者教育用に「DOTS ノート」を使用している施設の割合が高く、患者教育用の教材がないと回答した施設もあったことから、外来 DOTS 推進のためには

「DOTS ノート」を含めた媒体の開発および DOTS の包括的なガイドラインの策定の必要

性が示唆された。

3) 喫煙の結核への影響及び禁煙指導

患者の喫煙指導に関しては、発病後の喫煙習慣の変化の記録の励行とその評価をより綿密に行い、治療成績との関連について観察していく必要性が示唆された。

4) 患者の喫煙・禁煙の課題

喫煙と結核の関連が明らかになっており、喫煙習慣への介入を含む患者支援のモデルの開発が必要である。

5) 結核のリスク評価項目に対する介入

喫煙のリスク軽減が 21.4%と取り組みが不十分であるが、IUATLD による禁煙指導 ABC では定期的な DOTS 支援の機会を活用することが有効とされており、この考え方を導入した禁煙マニュアルを作成する必要がある。

6) 治療成績の自動設定アルゴリズム

今回の分析では、現行アルゴリズムで判定保留となったケースについて長期の治療成績の結果を見ると、結局 WHO 方式のアルゴリズムによる判定とあまり大きく異なることが知られた。

7) 「地域 DOTS を円滑に進めるための指針(案)」の検討

診療所を含む医療機関外来・薬局などとの連携を強化し、さらにさまざまな社会資源の活用による患者を中心とした質の高い結核医療と患者支援が求められていることから、『地域 DOTS を円滑に進めるための指針案』は、保健所を軸とした地域連携ネットワークの推進の手引書として期待される。

8) DOTS 実施状況の分析に基づく DOTS 実施率の算定式の検討

現行の国の結核登録者情報システムでは、DOTS タイプの入力は必須となっていないため、国のシステムからの DOTS 実施率の算定は難しく、入力項目の改善が必要と考える。

9) 結核病棟の入院継続困難例の調査