

Y., Kanamaru N., Kaneda Y., Takamori Y, McMurray D., Tan EV., Cang ML., Saunderson P., Cruz ECD. and Okada M., Novel therapeutic vaccines [(Hsp65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy., Hum Vaccines and immunotherapeutics:9(3)526-533.2013.

## 2. 学会発表

- (1) 喜多洋子、橋元里実、林清二、岡田全司. 結核患者血清中及び末梢血リンパ球から産生されるGranulysinやKsp37等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 平成25年結核病学会総会（千葉） 2013.3月
- (2) 喜多洋子、橋元里実、林清二、岡田全司. 新しい結核治療ワクチンの開発（Hsp65+IL-12 DNAワクチン）と他の薬剤・ワクチンとの相乗効果及びキラーT細胞分化. 平成25年結核病学会総会（千葉） 2013.3月
- (3) 西松志保、喜多洋子、橋元里実、仲谷均、西田泰子、林清二、岡田全司、高森靖. 患者血清中のGranulysinやKsp37等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 平成25年日本呼吸器学会（東京） 2013.4月
- (4) 西松志保、喜多洋子、橋元里実、仲谷均、木岡由美子、高見泰子、林清二、中島俊洋、金田安史、高森靖、岡田全司. granulysinワクチン及びKsp37ワクチンとキラーT細胞分化作用. 平成25年結核病学会・呼吸器学会近畿地方会（大阪） 2013.7月
- (5) 西松志保、喜多洋子、橋元里実、仲谷均、木岡由美子、西田泰子、林清二、井上義一、露口一成、岡田全司、高森靖. 患者血清中のGranulysinやKsp37等による難治性結核や再発の予後診断法開発. 平成26年日本呼吸器学会（大阪） 2014年4月
- (6) 喜多洋子、橋元里実、露口一成、鈴木克洋、井上義一、林清二、岡田全司. 結核患者血清中及び末梢血リンパ球から産生されるGranulysinやKsp37等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 平成26年結核病学会総会（岐阜） 2014年5月

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)  
(総合) 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 (miRNA) は、標的となる遺伝子の発現を微調整することにより、様々な疾患と関わることが知られ、ここ数年、感染免疫病態の指標としても注目されている。本研究では、IFN $\gamma$  遊離試験で LTBI の有無を判断された医療従事者(計 109 名)、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、全血由来の total RNA を得て、特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA 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。その結果、LTBI 群では miR-223 と IFN $\gamma$  遺伝子(*IFNG*) mRNA, miR-421 とインターロイキン 2 遺伝子(*IL2*) mRNA の相対発現量がそれぞれ負の相関を示しており、活動性肺結核患者では治療前で miR-223 と *IFNG* の mRNA 発現が負の相関を示していた。これらの miRNA が結核における宿主免疫応答を修飾している可能性が考えられた。結核の感染・発病・治療経過に関わる宿主要因の評価・解明を行うことにより、新たな遺伝子/蛋白発現制御マーカーが発見され、結核対策に応用されることが期待される。

A. 研究目的

結核の感染・発病・治療経過などには、病原体である結核菌の性質と、結核菌に対する宿主の免疫防御能、さらに環境要因による影響を考慮する必要がある。感染の成立後、発病に到るまでの期間は、潜在性結核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) の状態にあり、最終的に約 5-10%の感染者のみが発病する。この過程には個人差が大きく、結核菌と宿主反応の相互作用が深く関わっているものと推測されている。宿主の個体差による免疫防御能の違いを解明し、結核菌の感染あるいは感染から発症への高危険群の同定に関連する新規指標 (バイオマーカー) となる宿主側の因子を明らかにする

ことは重要である。また、多剤耐性結核の治療では、通常の薬剤感受性結核に比べて有効性が劣り毒性が強い治療薬剤を長期間投与する必要があり、その治癒には困難を伴う。このような治療が効果的な経過をたどり完遂されるためには、抗結核薬の直接の抗菌作用のみならず、同時に宿主による抗結核免疫反応が有効に結核菌排除に働くことの役割が大きいのではないかと推測される。多剤耐性結核の治療において、治療反応性を反映する簡便かつ的確な宿主側の指標を明らかにすることも治療の効率化のために必要である。

マイクロ RNA (miRNA) は動植物に存在する 20 塩基長程度の蛋白質をコードしない small

RNA で、標的遺伝子の蛋白発現を動的に制御することが知られており、近年、癌を始め、様々な疾患でバイオマーカーとして注目されている。miRNA はメッセンジャーRNA (mRNA)と同様に RNA polymerase II によりゲノムから転写された後に、miRNA 特有のプロセッシングを経て、特定の蛋白と結合して RNA-蛋白複合体を形成し、標的となる遺伝子 mRNA の主に 3' 非翻訳領域の相補的な配列部分に結合する。miRNA が結合した mRNA は、翻訳阻害による蛋白発現量低下ないし mRNA の安定性の変化による mRNA 量の低下をきたし、miRNA は mRNA から蛋白質への翻訳段階で、その発現を微調整する。最新のデータベース(miRBase 21)によると、ヒトでは現在までに 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。miRNA による遺伝子発現の制御の特徴は、相補的に mRNA と結合する配列の長さが短く、ひとつの miRNA がいくつもの mRNA に結合することができ、逆にひとつの mRNA にいくつもの miRNA が結合することができるという機能的柔軟性と、エクソソームに包まれ、あるいは蛋白質と結合して細胞から体液中に分泌され、遠隔の細胞にとりこまれてそこで遺伝子発現を調節することのできる時空間的柔軟性の 2 点が指摘できる。感染症分野において、感染免疫病態の指標として miRNA が持つ役割の研究はまだ始まったばかりであり、特に結核では miRNA の研究はまだ数が少なく、一定の結論は得られていない。

本研究では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。

## B. 研究方法

ベトナム ハノイ市およびホーチミン市における国際共同研究の一環として、日越倫理委員会の承認のもと、本研究を行った。

(1) ハノイ市の 109 名の研究参加者のうち、インターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )遊離試験で LTBI ありと判断された医療従事者 41 名、LTBI なしと判断された 68 名について、採血直後に RNA 安定化剤を付加して凍結保存した全血より total RNA を抽出し、研究に使用した。

miRNA 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。ターゲットとして測定する miRNA としては、結核における miRNA 発現網羅解析の報告 (Wang C, *et al.* PLoS ONE 6:e25832, 2011. Maertzdorf J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 109:7853-8, 2012. など) のうち、複数で関連が示されている 10 個の miRNA (hsa-miR-144, hsa-miR-155, hsa-miR-21, hsa-miR-181b, hsa-miR-223, hsa-miR-744, hsa-miR-421, hsa-miR-182, hsa-miR-660, hsa-miR-28-3p) を選び、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 から本研究対象検体において発現が安定して変動のないものを選び、その C<sub>q</sub> 値を用いた。それぞれの PCR 系の増幅については、T<sub>m</sub> 値の確認を行い、予想される T<sub>m</sub> 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。また、全血より抽出した total RNA を SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)と random nonamer で逆転写し、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム RT-PCR 解

析系にて、細胞性免疫に関わる代表的な遺伝子群 (*GNLY*, *PRF1*, *GZMB*, *STAT1*, *STAT4*, *STAT6*, *CXCL10*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL12A*, *SPP1*, *IL2*, *IL10*, *TGFB1*, *IL23A*, *TNF*, *LTA*, *IL15*, *IL18*, *FOXP3*, *TBX21*, *GATA3*, *HIF1A*, *IL4*, *RORC*) の mRNA 発現量を測定した。コントロールとしては、*GAPDH* を用いた。各 miRNA 相対発現量と細胞性免疫関連遺伝子群 (28 遺伝子) の mRNA 相対発現量を  $\Delta\Delta C_t$  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)。

(2) 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の国際共同研究として、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、全 RNA を抽出した。(1) で相関がみられた miRNA と免疫関連遺伝子 mRNA の組み合わせについて、(1) と同様に、*IFNG*, *IL2*, miR-223, miR-421 の定量的 RT-PCR 解析を行った。

(倫理面への配慮)

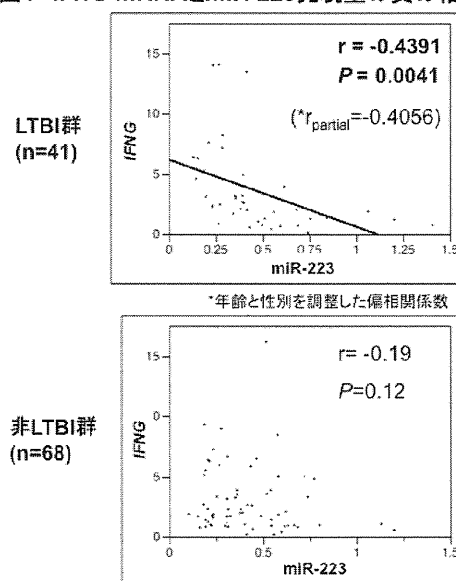
事前に研究計画書は、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除などを含む研究内容の説明を行った上で、研究への同意を書面で得た。

### C. 研究結果

(1) 医療従事者の全血中の miRNA, 免疫関連分子の遺伝子の各発現パターンについて、順位

相関係数を算出した結果、LTBI 群では、miR-223 と IFN $\gamma$  遺伝子 (*IFNG*) mRNA の発現量 (Spearman の順位相関係数 =  $-0.671$ ,  $P < 0.0001$ )、および miR-421 とインターロイキン 2 遺伝子 (*IL2*) mRNA の発現量 (Spearman の順位相関係数 =  $-0.608$ ,  $P < 0.0001$ ) が、それぞれ負の相関を示していた。しかし、非 LTBI 群では関連がみられなかった。LTBI 群において、年齢と性別を調節した偏相関係数は、miR-223 と *IFNG* mRNA が  $-0.4056$  (図 1)、miR-421 と *IL2* mRNA が  $-0.5356$  であった。また、LTBI 群と非 LTBI 群の間で、

図1 *IFNG* mRNAとmiR-223発現量の負の相関

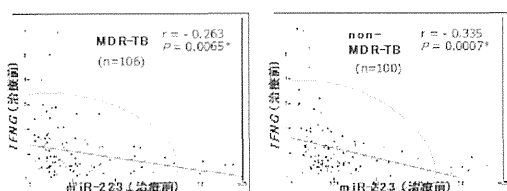


miR-223, miR-421, *IFNG*, *IL2* の発現量には有意な差が見られなかった。

(2) 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*

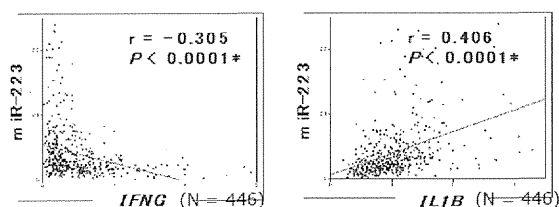
は、non-MDR-TB 群の3ヶ月でのみ弱く負の相関がみられた。図2に治療前の miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関を示す。

図2 治療前の miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関



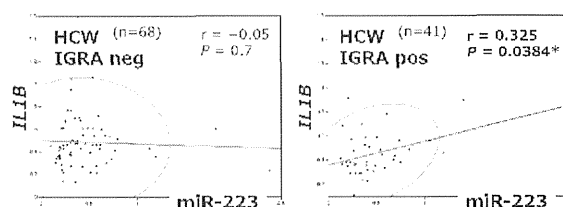
同一患者での治療前から3ヶ月への *IFNG* mRNA と miR-223 の発現量の動きを見ると、MDR-TB 群、non-MDR-TB 群ともに *IFNG* mRNA 発現量は増加傾向にあり、miR-223 発現量は減少傾向にあり、3ヶ月での miR-223 発現量は、多剤耐性結核より薬剤感受性結核で有意に低かった。miR-223 発現量が、治療開始前～3ヶ月で減少傾向にあるため、炎症が強い状態での発現増加の可能性を考え、全検体につき、miR-223 と *IFNG* と *IL1B* との相関を検討したところ、図3に示すように、miR-223 と *IFNG* 発現量との負の相関とは逆に、miR-223 と *IL1B* は正の相関を示した。

図3 miR-223 と *IFNG*, *IL1B* mRNA の相関



この結果をうけて、(1)の医療従事者についても *IL1B* の mRNA 発現量を検討したところ、図4に示すように LTBI 群でのみ、miR-223 と *IL1B* に正の相関が認められた。

図4 医療従事者における miR-223 と *IL1B* mRNA 発現量の相関



#### 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 $\gamma$  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。また、IL-2 は抗原によって活性化された T 細胞から分泌され、T 細胞の増殖や分化に関連し、エフェクター T 細胞やメモリー T 細胞の維持など、抗結核免疫における重要性が広く認識されている。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 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。

miR-223 は癌、感染症、炎症領域で既に様々な役割が報告されている miRNA であり (Haneklaus M, *et al.* J Intern Med 274:215-226, 2013)、顆粒球での発現が主体とされる一方で単球・マクロファージ系でも *IKK $\alpha$*  の直接的な発現抑制による NF $\kappa$ B 制御 (Li T, *et al.* Nat Immunol 11:799-805, 2010) など、炎症シグナル伝達系を介した免疫制御機能が知られている。miR-421 について免疫関連遺伝子発現調節機構を実験的に証明した報告はまだなされていないが、miRNA-mRNA の結合予測プログラムである miRANDA (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>),

TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) による解析結果から、*IL2* 遺伝子と *IL2* 受容体  $\gamma$  鎖遺伝子 (*IL2RG*) の 3' 非翻訳領域に miR-421 結合配列の存在が予測された。

特に miR-223 と *IFNG* mRNA の負の相関は、LTBI 群でも、活動性肺結核患者(MDR-TB, non-MDR-TB)の治療前でも認められ、結核症において、miRNA による抗結核免疫の制御が行われている可能性として注目された。LTBI 群では、非 LTBI 群に比べて miR-223 の発現量は変わらなかったが、LTBI 群でのみ miR-223 と *IL1B* mRNA の発現の正の相関がみられたことから、miRNA が 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考えられた。活動性結核患者群は現在治療後の経過観察中であり、今後、臨床情報をあわせて解析を行う予定である。本研究で得られた miRNA と免疫関連遺伝子の相関をもとに、各 miRNA が免疫関連遺伝子の発現調整に関わる可能性およびその機序を明らかにし、マーカーとしての意義をさらに追求する必要がある。また、疾患やその病態に関わる遺伝子の発現の微調整をする miRNA は、将来的には、創薬ターゲットとなる可能性を有している。miRNA やその類似核酸化合物による mRNA の阻害、あるいは逆にオリゴヌクレオチドで miRNA の機能を阻害する治療などの開発が考えられる。生物学的に製造する遺伝子治療薬と異なり、核酸医薬品はヌクレオチドの化学合成により作られるため、その製造方法や、drug delivery system (DDS) などのプラットフォームが確立すれば、核酸の配列を変えるだけで幅広い miRNA 創薬の可能性、応用範囲が生じるという大きな利点がある。特に困難が予想されるターゲット細胞内への DDS に関して、最近、新しい可能性を示した論文もあり(Cheng CJ, et al. *Nature* 518:107-10, 2015)、

このような技術の進展があれば、応用範囲が広く、注目される。

## E. 結論

IFN $\gamma$  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。その結果、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。さらに、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。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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hijikata M, Shojima J, Matsushita I, Tokunaga K, Ohashi J, Hang NTL, Horie T, Sakurada S, Hoang NP, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum Genet* 131 (5): 675-682, 2012.

Keicho N, Matsushita I, Tanaka T, Shimbo T, Hang NT, Sakurada S, Kobayashi N, Hijikata M, Thuong PH, Lien LT. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One* 7 (6): e38703, 2012.

Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females.

- Tissue Antigens 79 (3): 190-197, 2012.
- Sakurada S, Hang NT, Ishizuka N, Toyota E, Hung LD, Chuc PT, Lien LT, Thuong PH, Bich PT, Keicho N, Kobayashi N. Inter-rater agreement in the assessment of abnormal chest X-ray findings for tuberculosis between two Asian countries. *BMC Infect Dis* 12 (1): 31, 2012.
- Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A, Tokunaga K, Keicho N. Association of SLC11A1 (NRAM1) polymorphisms with pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) infection. *Hum immunol* 73 (5): 529-536, 2012.
- Hang NTL, Maeda S, Lien LT, Thuong PH, Hung NV, Thuy TB, Nanri A, Mizoue T, Hoang NP, Cuong VC, Ngoc KTT, Sakurada S, Endo H, Keicho N. Primary drug-resistant tuberculosis in Hanoi, Viet Nam: present status and risk factors. *PLoS One* 8 (8): e71867, 2013.
- Hung NV, Ando H, Thuy TT, Kuwahara T, Hang NT, Sakurada S, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Clonal expansion of Mycobacterium tuberculosis isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis in Hanoi, Vietnam. *BMC Res Notes* 6: 444, 2013.
- Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Ridruechai C, Tanuma J, Aoki T, Kantipong P, Piyaworawong S, Kobayashi N, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Oka S, Okada M, Khusmith S, Keicho N. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. *Int J Med Sci* 10 (8): 1003-1014, 2013.
- 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.
- Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Ridruechai C, Tanuma J, Aoki T, Kantipong P, Piyaworawong S, Kobayashi N, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Oka S, Okada M, Khusmith S, Keicho N, Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. *Int J Med Sci*, 2013. 10(8): p. 1003-1014.
2. 学会発表
- Hijikata M, Hang NTL, Yen NTB, Hong NT, Sakurada S, Lan NN, Kobayashi N, Dung NH, Keicho N. Association between Immune Gene Expression Levels in the Whole Blood from Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis and Their Treatment Outcome. In: 第52回日本呼吸器学会総会, 4月20日-22日, 神戸, 2012.
- Hang NTL, Hijikata M, Sakurada S, Tam DB, Ngoc PTM, Thuong PH, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Latent tuberculosis infection assessed by interferon-gamma release assay and mRNA expression levels of immune-related genes. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.
- Hang NTL, Maeda S, Thuong PH, Hoang NP, Hung NV, Cuong VC, Hijikata M, Sakurada S, Lien LT,

Keicho N. Sublineages of Mycobacterium tuberculosis and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Dual-specificity phosphatase 14 gene polymorphism in Vietnamese patients with pulmonary tuberculosis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

Yen NTB, Hijikata M, Matsushita k, Hang NTL, Hong NT, Lan NN, Dung NH, Keicho N. Circulating adipokines and immune-gene expression levels in patients with multidrug-resistant tuberculosis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

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)

(総合) 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-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。

### 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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

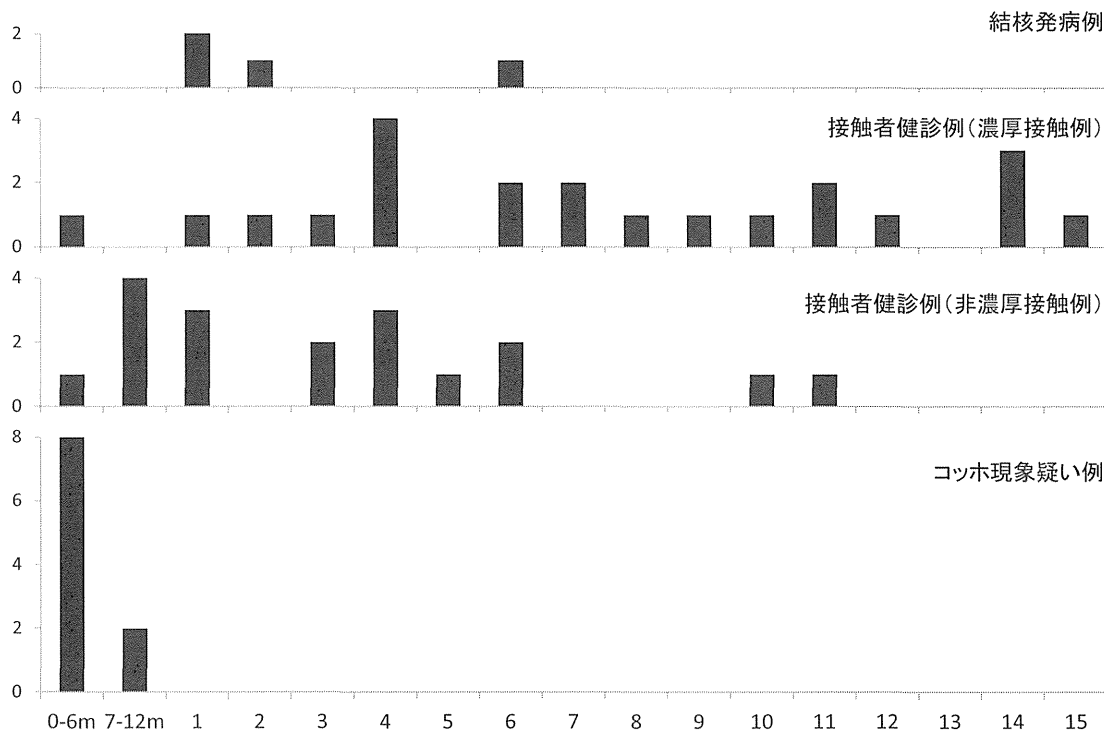
2) 接触者健診・濃厚接触例 (22例); 同居家族に喀痰塗抹陽性肺結核発症が明らかとなり、接触者健診の対象となった小児例

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。

図1. 各症例グループ 年齢分布



2. 年齢により IP-10 産生能の差異検討  
年齢群毎 (0 才、1-2 才、3-6 才、7-12 才、13 才以上) の QFT-3G 陰性コントロール、及び陽性コントロール検体上清中の IP-10 値 (それぞれ IP-10<sub>nil</sub>、IP-10<sub>mitogen</sub>) は表 1 の通りであった。各年齢群間で IP-10<sub>nil</sub>、IP-10<sub>mitogen</sub> 値ともに統計学的に有意な差異は確認されなかった。

3. コッホ現象疑い例 10 例における結核感染診断結果  
BCG ワクチン接種後早期にコッホ現象が疑われた乳児 10 例における、①接種後早期の局所所見 (高松らの提唱した局所所見 Grade 分類)、②ワクチン接種後 2 週間以内に実施したツ反結果、③QFT-3G 判定結果、

④T-SPOT 判定結果、⑤①～④の総合的評価に基づく結核感染判断 (治療適用判断)、⑥結核菌特異抗原刺激による IP-10 遊離量 (QFT- 3G 上清中 IP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値) は表 2 の通りであった。QFT- 3G 上清中 IP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値は①～④の情報を基に結核既感染例と判断した 5 例 (いずれも発病が示唆される病巣は認めず、未発病感染例 ≡ LTBI 例と判断) では 1149.0 ~ 9782.2pg/ml、非感染例と判断された 5 例では -5.4 ~ 365.0pg/ml の範囲に分布しており、これら 2 群で IP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値に重なり合いは見られなかった。

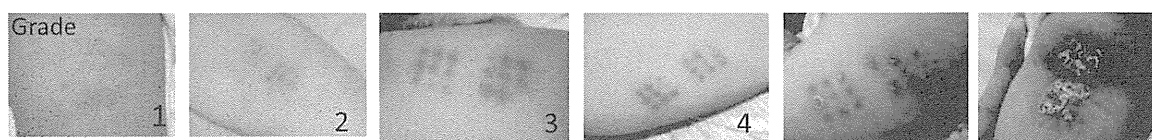
表1. 年齢によるIP-10産生能 (IP-10<sub>nil</sub>, IP-10<sub>Mitogen</sub>) の差異検討

age group	n	IP-10 <sub>nil</sub> (pg/ml)		IP-10 <sub>mitogen</sub> (pg/ml)	
		mean	SD	mean	SD
0y.o.	17	619.46	1065.35	37541.46	47617.80
1-2y.o.	8	630.92	576.71	22942.54	32233.69
3-6y.o.	15	533.75	441.54	44700.39	54921.16
7-12y.o.	10	387.32	390.85	20673.49	29313.37
13-y.o.	4	481.60	340.71	33675.30	26431.33

5つの年齢群間でIP-10<sub>nil</sub>、IP-10<sub>Mitogen</sub>それぞれの値に統計学的に有意な差異は認められなかった

表2. 「コッホ現象」疑い例における結核感染診断検査結果

受診時 月齢	BCG接種 局所所見 Grade分類	ツ反 (BCG接種後2週以内)		QFT-3G 判定	T-SPOT TB 判定	感染判断 ;LTBI治療 適用判断	IP-10 <sub>TB-Ag</sub> -IP-10 <sub>nil</sub> (pg/ml)
		発赤径 (mm)	硬結径 (mm)				
6	5	0	0	—	—	LTBI	2307.9
4	6	10	4	±	—	LTBI	1149.0
5	6	13	9	—	—	LTBI	9782.2
5	5	13	5	—	—	LTBI	1382.7
10	5	18	5	—	—	LTBI	4933.3
6	4	0	0	—	—		-5.4
8	3	5	5	—	—		12.7
6	4	15	0	—	—		20.0
5	3	1	1	—	—		365.0
6	4	5	2	—	—		38.2



4. 文献報告例に基づく結核感染診断カット  
オフ域の設定と各症例グループにおける  
IP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値の分布

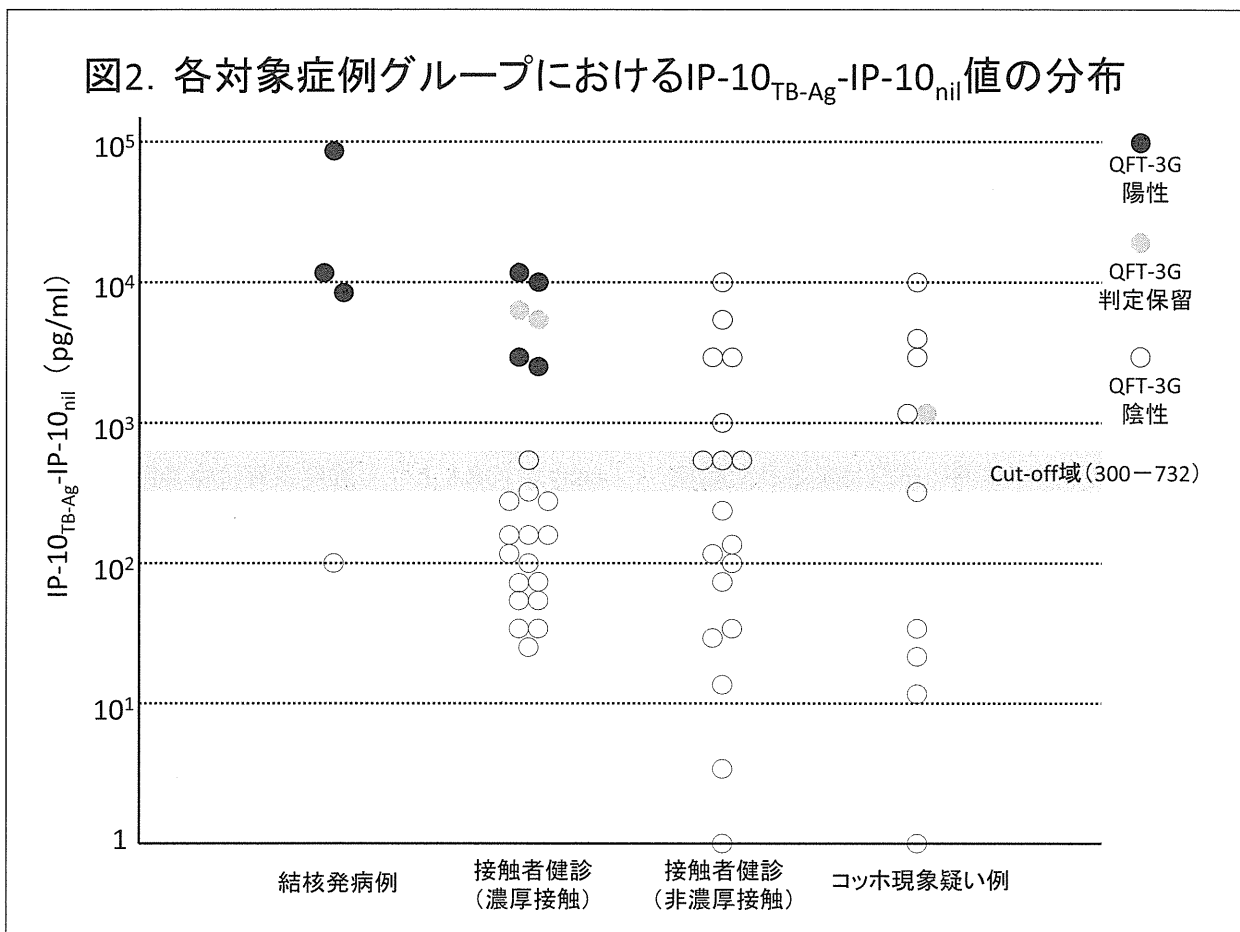
今回の我々の検討では非感染群（即ち、結核感染のリスクが極めて低いと評価される陰性コントロール群）を設定しておらず、その結果より結核感染診断におけるIP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> Cut-off 値を検討・設定することはできない。これまでの報告例では感染群（発病群）、及び非感染群をおいた検討より、IP-10 を指標とした結核感染診断に有用な Cut-off 値が設定されているが、その多くは 300~732pg/ml に設定されている

(Ruhwald M.et al. Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarker for the diagnosis of tuberculosis. Eur Resp J 2008 ; 32 : 1607-1615, Lighter J. et al. Chemokine IP-10 an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. Int J Tuberc Lung Dis

2009 ; 13 : 731-736 など )。

本検討においてもこの幅を Cut-off 域と設定し、各グループ症例におけるIP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値の分布と共に図 2 に示した。即ち、結核発病例、接触者健診・濃厚接触例ではQFT-3G 陽性例と「IP-10 陽性」例（=IP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub> 値が Cut-off 域を超えた例）が一致していたが、接触者健診・非濃厚接触例 18 例で QFT- 3G 陽性例は認めなかったが、5 例が「IP-10 陽性」を示し、またコッホ現象疑い例 10 例で 1 例のみが QFT- 3G 判定保留を認めたが、5 例が「IP-10 陽性」を示した。今回の検討で QFT-3G 陰性／「IP-10 陽性」を呈した例は全て未発病例であり、その結核感染診断の妥当性、即ち、これらが真の結核感染を鋭敏に検出しているのか否か、を評価することは困難である。

図2. 各対象症例グループにおけるIP-10<sub>TB-Ag</sub>-IP-10<sub>nil</sub>値の分布



D. 考察

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。コッホ現象が疑われる例を対象として、ワクチン接種後局所所見とその時間的推移、ツ反結果、IGRA 結果を総合的に評価して感染判断を行っているが、その判断にはしばしば難渋する。即ち、ツ反では発赤が 10 mm を僅かに越える程度で、硬結を伴わない「陽性」例がしばしば散見

されること（ツ反「非特異的陽性」例が混じっている可能性）、また IGRA 陽性例の多くは同時に発病も判明する例であり、ワクチン接種局所の所見やツ反結果より結核感染の可能性が強く疑われるが、発病所見を認めない例（≡未発病感染例）で IGRA 陽性を呈する例が非常に少ない（乳児 LTBI 例診断における IGRA の感度不良の可能性）、などの問題点を抱えている。成人の菌陽性肺結核発病例においても 10~15% が IGRA 陰性を呈することも知られており、結核菌免疫応答がさらに弱く、IGRA の感度がさらに劣ることが想定される乳幼児や HIV 感染例を対象に、より鋭敏な結核感染診断法の導入が期待されており、近年、IFN- $\gamma$  以外の biomarker を指標とした結核感染免

疫診断の有用性に関する検討が進められている (Chegou N.N. et al., Beyond the IFN- $\gamma$  horizon: : biomarkers for immunodiagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis. Eur Respir J 2014 ; 43 : 1472-1486 )。これらのうち、単球・マクロファージから放出される chemokine の一つである IP-10 (CXCL10) を指標とした感染診断の有用性を示唆する論文が多く報告されている。マクロファージ表面に抗原呈示された結核菌成分を認識した T 細胞からは IFN- $\gamma$  や IL-2 などのサイトカインが遊離されるが、さらにこれらのサイトカインの刺激により活性化したマクロファージからは IP-10 を含む多種の炎症性ケモカインが放出されている。結核感染免疫診断において IP-10 をマーカーとするメリットとしては、①IFN- $\gamma$  のみではなく、IL-2 や TNF- $\alpha$  など多くのシグナル刺激を受けて遊離するケモカインであり、結核感染に伴う免疫応答が (IFN- $\gamma$  よりも) さらに増幅され、感染の有無を判定しやすい可能性、②IFN- $\gamma$  に比して、その放出量が多く (約 100 倍)、Cut-off 値が設定しやすい可能性、③IFN- $\gamma$  と異なり、抗原刺激に伴う遊離量に年齢による差異を認めない、などの点が挙げられる。③については我々の検討においても年齢によって IP-10 産生能に差異がないことが確認された (表 1)。

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 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。

## E. 結論

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。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

1. 論文発表 なし

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.

第 47 回日本小児呼吸器学会 (2014.10.24 東京)

#### 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

全てなし



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)

(総合) 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

わが国における小児結核の実態に明らかにするため、また小児結核感染・発病例に対する診療精度を向上させることを目的に以下の調査・研究を行った。

### 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

#### 1-1. 小児を対象とした結核感染診断における QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

近年新たに導入された2種類のIGRA (IFN- $\gamma$  release assay)、即ち、QFT-GIT (QuantiFERON TB Gold In-Tube,商品名 クオンティフェロン®TB ゴールド) 及び、T-SPOT. ®TB (商品名 T-スポット. ®TB) の小児を対象とした結核感染診断におけるパフォーマンスに関する検討を目的に、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った。その結果、①QFT-GからQFT-GIT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-GIT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発病例を対象としてはQFT-Gと同様に良好な感度を認めた、④BCG接種後局所所見推移やツ反結果より「結核既感染例」と判断したコッホ現象例で発病例を除いてIGRA陽性例は認めず、乳児未発病感染例(≒LTBI例)における感度不良が示唆された。

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すために非常に有用な姿勢と考えられた。

#### 1-2. 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-10TB-Ag-IP-10nil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. 小児結核発病例の実態に関する調査研究**

低蔓延状況において発病に至った小児結核症例の背景要因や診断・治療適用に関連する課題を明らかにし、さらに有効な小児結核対策を考案・適用することを目的として、2011年に「結核登録者情報システム」に登録された小児結核症例全例を対象とした実態調査を実施した。

その結果、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。

これらの結果をふまえ、さらに小児結核症例を順調に減少させるため、①さらにわが国全体の結核罹患状況が低蔓延へと移行するまでの間、高いBCGワクチン接種率を維持する、②症例が特に集積している大都市部を対象とした選択的な対策の継続（首都圏及び近畿地区小児結核症例検討会の継続的開催等）、③結核高蔓延国からの転入小児に対するタイムリーかつ有効な発病スクリーニング検査の適用、④結核感染・発病リスクが高い環境（衛生意識の低い家庭環境、被虐待例、経済的な貧困等）で生活する子どもたちに対する積極的な支援、⑤小児に対する「結核医療の基準」の呈示、⑥小児結核症例全例の発症時登録制度をスタートさせ、その感染・発病診断、治療内容に関して小児結核専門医からタイムリーな助言や指導を受けることが可能なシステムを構築する、等の取り組みが必要と考える。

## **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**

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。

#### 4. 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・臨床関係者の中で共有して今後の対策に活かすことを目的に、首都圏（第3～5回）及び近畿地区（第10～12回）での小児結核症例検討会を開催した。それぞれの地区における症例検討会には毎回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。各症例検討会の呈示症例からは「外国人結核」、「小児に対する結核感染診断」、「小児重症結核に対する医療提供体制」、「コッホ現象」、「正確な画像診断」、「脆弱な家庭機能の支援」、「薬剤耐性結核」、「結核性髄膜炎」、「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」、「妊産婦結核」、「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」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。

##### 研究協力者

森 亨（結核予防会結核研究所）  
原田 登之（免疫診断研究所）  
樋口 一恵（免疫診断研究所）  
宮野前 健（国立病院機構南京都病院 小児科）  
宮川 知士（東京都立小児総合医療センター）  
石立 誠人（東京都立小児総合医療センター）  
金子 忠弘（東京都立小児総合医療センター）  
今川 智之（横浜市大小児科）  
野澤 智（横浜市大小児科）  
原 良紀（横浜市大附属病院小児科）  
吉河 道人（国立病院機構旭川医療センター）  
土居 悟（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）

釣永 友希（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）  
錦戸 知喜（大阪府立母子保健総合医療センター）  
宮城 伸浩（大阪市立十三市民病院）  
西屋 克己（香川大学医学部医学教育講座）  
鶴田 悟（神戸市立医療センター中央市民病院）  
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）  
小森 友喜（京都第一赤十字病院小児科）  
石井 紘介（中野こども病院小児科）  
前田 秀雄（東京都福祉保健局）  
成田 友代（東京都世田谷区世田谷保健所）  
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）

小向 潤（大阪市保健所感染症対策課）  
 藤山 理世（神戸市健康福祉部）  
 渡部 ゆう（東京都感染症対策課）  
 森川 雪子（東京都福祉保健局）  
 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）  
 佐野 智子（西神戸医療センター）  
 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）  
 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）  
 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.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

1-1. 小児を対象とした結核感染診断におけるQFT-GIT及びT-SPOT TB反応性の比較  
 近年新たに導入された2種類のIGRA（IFN- $\gamma$  release assay）、即ち、QFT-GIT（QunatiFERON TB Gold In-Tube,商品名クオンティフェロン®TB ゴールド）及び、T-SPOT.®TB（商品名 T-スポット.®TB）の小児を対象とした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。

##### 1-2. 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. 小児結核発病例の実態に関する調査研究 低蔓延状況において発病に至った小児結核症例の背景要因や診断・治療適用に関連する課題を明らかにし、さらに有効な小児結核対策を考案・適用する

##### 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接触者健診及び事後対応の実態を把握すると共に、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

##### 4. 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、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