

表10. 適用した結核感染診断検査

適用した感染診断	例数		
		IGRA併用せず	47
ツ反	63	一部IGRA併用*	12
		全例IGRA併用	4
T-SPOTのみ	1		
記載なし	3		
	67		
*IGRAを適用した条件		例数	
年齢:5才(6才)以上		5	
ツ反で「有意な反応」を認めた例(発赤30mm/硬結15mm以上)		5	
BCG既接種例		1	
結核患者と濃厚な接触があった例		1	

11. 感染判断基準

BCG 未接種例；多くは発赤 10 mm、または硬結 5 mm を越える例を感染例と判断している。

BCG 既接種例；結核病学会の基準（日本結核病学会予防委員会“今後のツ反検査の暫定的技術基準”、2006年5月）に沿うものが多いが、集団におけるツ反分布をヒストグラムにて検討し、二峰性と評価される集団を感染例とした事例や2回目のツ反で反応が有意に大きくなっている例を感染例とした事例、或いはツ反が有意な反応を認めた例に対して IGRA を追加して適用して感染判断を行った事例なども見られた

12. 画像検査の適用基準

多くはツ反や IGRA で感染例と判断された例を対象に胸部単純レントゲン検査が実施されていたが、一部では健診対象例全例に対して検査が適用されていた。

13. 感染・発病判断（表 11）

医療機関での接触事例 3 事例、保育所/幼稚園等での接触事例 18 事例、地域サークルでの接触事例 1 事例で乳幼児集団で感染例が

確認された。これらの事例では他の年齢健診対象グループにおいても感染の拡がりを認める事例が多く、概ね妥当な感染判断がなされているものと推測される。

22 事例で健診対象となった乳幼児集団での「感染あり」と判断され、1 事例で発病例が確認された（保育園での健診事例、感染源となった保育士；病型 bII2 咳は長期に持続、マスク着用せず、他に感染例 22 例、他の年齢群での接触者においても 6 例の感染例を認めた）。

9 事例では「集団感染」と定義される感染・発病の拡がりを認め（保育園/幼稚園、幼児教室 5 例、医療機関 3 例、地域サークル 1 例）、このうち 6 事例で乳幼児集団における感染事例が確認された（保育園/幼稚園、幼児教室 4 例、医療機関 1 例、地域サークル 1 例）。

表11. 感染・発病判断

接触があった場所	感染の拡がり(人)	例数	他の年齢健診対象グループにおける感染の拡がり
医療機関	0-4	2	2
	5-9	1	1
	計	3	3
保育所/幼稚園・幼児教室等	0-4	10	7
	5-9	4	0
	10-14	2	2
	15-19	0	0
	20-	2	2
計	18	11	
地域サークル	0-4	1	1
合計		22	15

14. 結核対策専門家へのコンサルト

42 事例で結核対策専門家にコンサルトがされており、コンサルトした専門家は結核研究所 26 事例、地域の結核診療専門家（呼吸器内科医師、審査会委員、結核行政専門家等）12 例、小児結核専門医 7 例などであった（重複例あり）。

15. 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

医療機関が主体となって健診を計画、実施した事例が多く、保健所は健診の実施時期、範囲設定、内容などに関して助言を行うケースが多く見られた。一方で健診を全て保健所が実施した事例もみられた

16. 健診の計画、実施等において苦慮した点（順不同）

- ・ 保護者への対応；結核という病気に関する理解、感染や検査（レントゲン検査等）実施に関する不安への対応

- ・ 健診日程の設定；受診しやすいように夜間や複数回の設定を要する

- ・ 健診対象者が広域に広がったため、他の保健所等との調整を要した；産科、NICU/GCUなどでの接触事例では里帰り例も多いため

- ・ 対象者の選定；乳幼児の特殊性を考慮に入れる一方で、特に接触があった結核患者が低感染性であった場合や接触時間が短い場合など

- ・ 接触状況の把握が困難；特に保育園などで受け持ちを特定せずに多くのクラスを担当している事例では接触のあった乳幼児や接触の程度を把握することが困難

- ・ 健診対応医療機関の確保；乳幼児の健診に対応してもらえる医療機関の確保が困難

- ・ 乳幼児集団に対する健診実施の経験がなく、その企画や実施に苦慮した；健診対象や実施時期の選定、適用すべき結核感染診断検査の選択、また感染判断

- ・ 元患者の人権への配慮；保護者からは詳細な情報を求められるが、一方で元患者の人権にも配慮する必要性

D. 考察

全国全ての保健所を対象とした本調査により、乳幼児集団を対象とした結核接触者健診が毎年 20 事例程度企画、実施されている実態が明らかとなった。結核患者との接触機会としては保育園/幼稚園における接触事例が多く、以下、産科病棟や NICU/GCU などの医療機関、地域サークルなどが続いていた。報告された調査内容からは、接触者が BCG 未接種例も含む乳幼児であることを考慮に入れて、特に慎重な健診企画、実施、感染判断が行われている様子が見られた。即ち、接触が確認された結核患者の感染性が低いケースであっても接触が明らかとなった乳幼児は健診実施の対象とされ、また、特に BCG 未接種新生児・乳児においては結核患者との接触が判明した後、最終的な感染判断が可能となる時期まで期間（=window period）は無差別に LTBI 治療の対象とする、などの慎重な対応が執られているケースが多いことが確認された。今回、報告された 67 事例のうち、22 事例で接触があった乳幼児における感染の拡がり確認され、このうち、保育所/幼稚園、幼児教室などでの接触事例が 18 例を占めた。医療機関での接触事例は産科病棟、NICU/GCU などにおける新生児との接触事例が多く、万が一、感染があった場合には発病に至るリスク、重症化に至るリスクが高く、window period における LTBI 治療適用などの慎重な対応も必要であるが、一方で接触機会が比較的少ないという特徴も有するため、実際に感染・発病の拡がりに結び付く事例は少数例に留まる。これに対して、保育所/幼稚園等での接触事例では接触機会は頻回、かつ長期に渡り、また、濃密

な接触機会も多いと想像され、乳幼児に対する感染リスクも高いものと推測される。乳幼児集団を対象とした健診の企画・実施に関しては多くの課題が報告された。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する。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と思う。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

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・実施に際して依頼することが可能な「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。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- なし

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

乳幼児集団を対象とした接触者健診事例に関する調査票 (Ver.1)

保健所名: () 都道府県 () 保健所

回答担当者: _____

連絡可能なメールアドレス: _____

乳幼児集団を対象とした接触者健診事例経験の有無

2009年1月～2013年12月の間に、乳幼児集団を対象とした接触者健診(*)を企画・実施しましたか?

(*)産科・小児科医療機関や保育施設等において感染性を有する結核患者が発生し、接触があった乳幼児集団を対象に企画、実施された接触者健診(但し、家族検診を除く)

はい・いいえ

「はい」の場合は以下の設問にお答え下さい。

「いいえ」の場合にも、最後の設問 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)への回答をお願い致します。

Q1.健診実施を企画・実施する契機となった結核患者が登録された時期

- () 2009年
- () 2010年
- () 2011年
- () 2012年
- () 2013年

複数の事例がある場合には、お手数ですが、調査票を複写して、事例毎に以下の調査項目にご回答下さい

Q2. 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項目

・乳幼児と接触があった場所

- () 医療機関
 - () 産科病棟、() GCU/NICU、() 小児科病棟、() 外来(診療科; _____)
 - () 乳幼児健診・集団予防接種その他(具体的に; _____)
- () 保育所/幼稚園、幼児教室等(具体的に; _____)
- () 地域サークル(例 子育てサークル)(具体的に; _____)
- その他(_____)

・年齢; _____ 歳

・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(_____) m²

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

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, 近松絹代, 加藤朋子 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

研究要旨

結核菌はエアロゾル感染する病原体であり、感染制御・管理上の重要な対象である。その感染源は主として活動性肺結核患者であるが、感染管理あるいは患者管理の点から、患者が生菌を排出しているか否かを判定することが重要となる。現在その手段はほとんど抗酸菌培養検査に依るが、結核菌はいわゆる遅発育菌であるため、特に死菌であることを培養陰性結果として判定しようとするに 6～8 週間の時間がかかる。これを解決することを目的として、培養結果を迅速に推定するための結核菌生死菌定量核酸増幅判定システムの開発を開始した。

一般細菌において Propidium Monoazide (PMA)あるいは Ethidium Monoazide (EMA)が死菌の細胞膜を通過し（生菌では通過しない）、遺伝子の二重らせんにインターカレートし、核酸増幅を抑制することが知られており、この原理の結核菌への応用を行った。PMA をハロゲンランプ光照射で作用させた系で結核菌の死菌の核酸増幅抑制効果が認められたが、再現性に問題が認められたため、最終的に EMA を LED で作用させる系を作成した。これにより比較的安定した死菌増幅抑制効果が得られたが、結核菌の死菌モデルの適正性や比較対象とした Auramine O-CTC 二重染色による生菌率測定信頼性に問題を示唆する結果が得られており、今後も検討の継続が必要と考えられた。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。

<研究協力者>

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

結核菌はヒトからヒトへ感染する病原体であるため、感染管理には特段の注意が必要である。現在、結核菌を排菌していることが明確な患者（塗抹陽性あるいは培養陽性）は、

感染性の消失が確認されるまで一般的に隔離される場合が多いが、完全な感染性の消失は培養検査の陰性をもってしなければならないため、最終的な培養陰性の判定までに 6～8 週間の時間を要する。場合によっては患者はこの培養結果判定までの期間を隔離状態で過ごすことになり、人権の観点からも看過できない状況である。培養の結果を短期間に予測判定することが可能となれば、この状

況を改善することに有用であることは明白である。また、時に遭遇する「塗抹陽性・培養陰性」が継続する症例にも有用性が期待される。さらに培養結果の定量的判定が可能であれば、薬剤感受性試験における検査時間の短縮にも利用の可能性が考えられる。以上の点を考慮し、定量核酸増幅法を用いて結核菌の生死判定を行う検査系の開発を目的として研究を実施した。

B. 方法

【市販核酸増幅装置の定量性の検討】

一般に使用されている核酸増幅法検査キット（装置）は、定性試験として承認されているものである。しかしながら、多くの装置は定量性を有しており、他の検査結果と相関する。中でも real-time PCR は一般的な各算定料に用いられており、本研究では real-time PCR 装置である COBAS TaqMan 48 (Roche Diagnostics) を使用し、市販結核菌検出キットである TaqMan MTB (Roche Diagnostics) の定量性を評価した。

具体的には培養結核菌 (H37Rv ATCC27249) を Middlebrook 7H9 培地で増殖し、 $OD_{530}=0.17$ の時点で菌原液とした。これから 10 倍希釈系列 (10^{-1} - 10^{-5}) を作製し、定量培養および TaqMan MTB による定量を行った。TaqMan MTB の定量についてはコントロールの濃度を 20 cfu/ml として、以下の式に従って算出した。

$$\text{Number of MTB bacilli} = (2^{(Ct/p - Ct/s)}) \times 20$$

Ct/p: コントロールの Ct 値

Ct/s: 検体の Ct 値

また、53 の臨床検体（喀痰）を活動性結核患者から収集し、一部については「塗抹陰性・培養陽性」の検体を作製するため 10 倍

希釈系列 (10^{-1} - 10^{-5}) を作成した。最終的に希釈検体を含めた検体数は 67 となった。これらの検体を MGIT (Becton Dickinson) で培養し、培養陽性までの日数 (Time to detection: TTD) を記録した。同じ検体 100 μ l を TaqMan MTB にて測定し、Ct 値を得た。さらに同じ検体 50 μ l を使用して抗酸菌塗抹検査 (Auramine O 染色) を実施し、塗抹陽性度を記録した。

【PMA/EMA による結核菌の生死判定】

a) Propidium Monoazide (PMA)

他の論文等で頻用されていることから、PMA を対象に研究を開始した。この薬剤は死菌、つまり細胞壁が脆弱になっている細菌の細胞内に入り込み、DNA の二重鎖構造に挿入結合し、光照射により架橋を形成して乖離を阻害することにより PCR による増幅を抑制するとされている。

<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。

<至適 PMA 濃度の検討>

菌液の準備: *M. tuberculosis* H37 Rv を Middlebrook 7H9 培地に接種し、 OD_{530} を 0.05 に調製した。37°C で培養し、7 日後に実験を行った。 OD_{530} を 0.170 に調製したものを生菌として使用した。死菌の調製は、菌液 100

μL が入ったマイクロチューブを沸騰水で 8 分間煮沸した。

PMA-PCR 系による生菌数の定量：マイクロチューブに菌液を 100 μL ずつ分注し、1/15 リン酸緩衝液で 1 回洗浄後、100 μL のリン酸緩衝液に懸濁した。PMA を 25, 50, 100 あるいは 200 μM で添加し、vortex ミキサーで攪拌後、室温、暗所で 5 分間インキュベートした。(途中で攪拌)。氷上で 600W のハロゲンランプを 1 分間照射したのち、菌液を遠心し (14,000 rpm, 5 分)、滅菌水で洗浄した。さらに遠心し、上清を除去したのち、アンプリコ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 200 μL の DNA 溶液を得た。リアルタイム PCR システム (Roche/コバス TaqMan48) を用いて遺伝子量の半定量を行った。試薬はコバス TaqMan MTB (Roche/#490249) を用いた。陽性コントロールが 20 copy/reaction であるので、陽性コントロールの Ct 値との差からサンプル中の DNA 量を換算した。

7H10 培地における CFU：菌液を滅菌水で希釈し、100 μL を培地に接種した。3 週間後にコロニー数が 20~200 個の希釈倍数のプレートのコロニー数を計数した (N=3)。

<ハロゲンランプを使用した PMA-qPCR 系による生菌数の定量>

前述の特性より、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と考えられる。100 μL 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 (14,000rpm、5 分) し、上清を捨て Phosphate buffer (PB, pH 6.8) 100μL で菌を再

懸濁した。用意した菌液のうち 3 本に終濃度 100μM となるように 2mM PMA 5μL 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 100μL で洗浄した。再度遠心し上清を除去し、アンプリコ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で処理を行い 200 μL の DNA 溶液を抽出した。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。

<LED 照明を用いた PMA-qPCR 法による生菌数の定量>

前述の検討過程でハロゲンランプの使用による非特異的増幅抑制反応が疑われたため、波長幅の狭い LED ランプへの光源の変更を行った。

100 倍希釈した菌液を 100μL 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 100μM 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 0μM、100μM、150μM、200μM 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 ~ 10^5 倍希釈の菌液 100μL を接種) で、Z-N 染色法による全菌数カウントは、 10^2 ~ 10^4 倍希釈の菌液を 2μL 塗抹 (n=3) して行った。

<培養法による生菌率の測定>

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 $2\mu\text{L}$ 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 $100\mu\text{L}$ (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。

< Auramine O-CTC 二重染色法 >

菌液 $200\mu\text{L}$ を 1.5mL チューブに分注し遠心、PBS 1mL で洗浄後、PBS $200\mu\text{L}$ にて菌を再懸濁した。CTC 溶液 $4\mu\text{L}$ および Enhancing reagent B $1\mu\text{L}$ (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、 $2\mu\text{L}$ 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 450nm 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。

b) Ethidium Monoazide (EMA)

<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 実験系での死菌抑制効果の不安定性が問題となり、初期検討で一旦対象外としていた EMA について再検討を行った。

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 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように $5\text{mg}/\text{mL}$ EMA 7.5μ 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、PB 1mL 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 $100\mu\text{L}$ 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 $2\mu\text{L}$ 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 (煮沸菌については 10 倍希釈) した菌液を $100\mu\text{L}$ 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 5 N) 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 PB 1mL 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、PB 1mL 添加し遠心 ($13,000\text{g}$ 、5 分) し、再度 PB 1mL 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) 薬剤感受性試験への応用

<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 $\text{OD}_{530} = 0.05$ に調整、径 18mm のスクリーキャップ付試験管で 37°C にて $\text{OD}_{530} = 0.17$ になるまで培養した。7H9 培地 4.8mL に前記の菌液

100 μ L、薬剤投与群にはINH (5 μ g/mL) または RFP (50 μ g/mL) を最終濃度がそれぞれ 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL になるように 100 μ 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製した。

<倫理上の配慮>

喀痰検体の収集は結核予防会複十字病院で行い、各対象者からインフォームド・コンセントを得ている。

C. 結果

【市販核酸増幅装置の定量性の検討】

培養結核菌の希釈系列を用いた定量試験では、コロニー数と TaqMan MTB の Ct 値の間に有意な直線的相関が認められた (Pearson's correlation coefficient: $r = -0.982$, $p < 0.001$)。

臨床検体を用いた試験では、培養陽性となったのは 57 検体であった。塗抹陽性度と TaqMan MTB の Ct 値、塗抹陽性度と MGIT TTD、TaqMan MTB の Ct 値と MGIT TTD の間にそれぞれ有意な相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficient, $r = -0.940$, $P < 0.001$, $r = -0.721$, $p < 0.001$ 及び Pearson's correlation coefficient: $r = 0.737$, $p < 0.001$)。

【PMA/EMA による結核菌の生死判定】

<至適 PMA 濃度の検討と PMA-qPCR による

生死菌定量>

実験では PMA の濃度依存的な抑制が認められた。加熱死菌における PMA の効果は、25 μ M でも 92%の抑制、100 μ M では 98%の増幅抑制が認められた。生菌の抑制率がやや高いように思われたが、本実験で使用した菌の OD が 0.4 以上とかなり増殖していたため、生菌の割合が低かった可能性が考えられた。PMA の至適濃度を 100 μ M と設定したが、実験ごとに死菌の増幅抑制効果が安定しない傾向が認められた。また、PMA 添加で生菌率が 100%を超える (計算上) 場合も観察された。

<PMA-qPCR の薬剤感受性試験への応用>

PMA-qPCR 法の薬剤感受性試験への応用を検討した。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

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。

臨床分離株（感受性菌2株、耐性菌2株）を用いて行った再実験では、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。

<EMA-qPCR系の検討>

結核菌におけるPMA-qPCR系の不安定性が認識されたため、EMAを再評価した。また、菌の生死に影響を及ぼす（不安定性の一因の可能性）を考慮し、ハロゲンランプをLEDに変更した。

対数増殖期の菌（H37Rv）を用いて、EMA 150µg/mL作用下でのLED照射時間を検討した。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。

<死菌作製方法による差異の検討>

3つの異なる殺菌方法で処理した菌を用いてEMAの効果を検討した。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、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の効果は低かった。

< Auramine O-CTC 染色の検討 >

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。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。

対数増殖期の結核菌（H37Rv）と*M. avium*のAuramine O-CTC二重染色を行った。MACではほぼ100%菌が呼吸活性を持つのに対し、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が染まり難い結果であった。

D. 考察

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。同様の定量性はGeneXpert systemにおけるXpert MTB/RIF (Cepheid, USA)でも証明されている (Blakemore R, et al., 2011)。Xpert MTB/RIFもTaqMan MTBも共にゲノムにシングルコピーとして存在する*mpoB*あるいは16S rRNA遺伝子を標的としており、なおかつreal-time PCRシステム（検出系はXpert MTB/RIFがMolecular Beacon、TaqMan MTBはTaqMan probe）を使用しており、共に定量性があることが予想されていた。今回TaqMan MTBに定量性が証明されたことにより、今後結核の治療モニタリングへの応用が展望されることとなった。

上記の前提を受けて、結核菌の核酸増幅法による生死菌判定の検討を行った。まず PMA-qPCR 定量系を薬剤感受性試験に応用し試験の迅速化等を評価した。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が、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、チール・ネールゼン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。MAC の Auramine O-CTC 二重染色ではほぼ 100%の菌が CTC で染色されていることから、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、休眠菌などはチール・ネールゼン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。

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ため生菌が障害される可能性も考えられた。そのため光源を LED に変更したが、生菌率は 50%前後と低いままであった。初期検討の結果から試薬として 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ため、EMA と LED の組み合わせを検討した。結果として 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。

実験で使用する死菌のモデルにも注意が必要であった。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。

これまでの試行錯誤により、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。

E. 結論

核酸増幅法を利用した結核菌の定量的生死菌判定システムの開発を行った。定性試験として承認されている市販の結核菌同定キットにも適切な定量性があることを証明した。PMA と EMA を用いて核酸増幅抑制効果を評価したが、結核菌については EMA と LED の組み合わせにおいて信頼性 (効果と安定性) が高いと考えられた。

F. 健康危機情報

本研究においては、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

1. 加藤朋子, 近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 御手洗聡. Propidium monoazide (PMA)を用いた生物活性をもつ結核菌の定量的検出法の検討. 結核 2013; 88: 268. 第88回日本結核病学会総会 千葉 2013年3月28-29日
2. 加藤朋子, 山田博之, 御手洗聡. PMA-PCRによる結核菌の生菌及び死菌の鑑別. 日本細菌学会雑誌 2014; 69(1): 139. 第87回日本細菌学会総会 東京 2014年3月27日
3. 高木明子, 加藤朋子. 生菌死菌を迅速に鑑別できるか? 日本結核病学会雑誌 2015; 90(2): 203. 第90回日本結核病学会総会 長崎 2015年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし。

厚生労働省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)
(総合) 分担研究報告書

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

研究分担者 前田伸司 結核予防会結核研究所抗酸菌部
結核菌情報科 科長

研究要旨

近年、ゲノム解析技術の進歩により安価に次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析が可能になって来た。NGS 分析で明らかになる一塩基多型 (SNP) を利用することによって、① 新しい型別法として感染経路の推定が可能かどうか、② 特定株の表現型を既定する責任遺伝子の検索が可能か等検討を行った。① に関しては、接触者調査により初発患者から家族内 3 名、出張先の同僚 1 名への感染が起こったと推定された例を利用した。初発患者株も含めた分離結核菌の型別を行い、IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析で同一パターンであることを確認した。これらの株の Large sequence polymorphisms (LSP) 及び遺伝系統を調べると、RD181 及び RD150 陰性の北京型-modern 株だった。RD150 領域が欠損した株なのでマイナーな系統であることが判明した。SNP 部位の比較を行うと、本例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。つまり、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。② に関しては、結核菌 M 株 (RFLP で同一パターン及び VNTR で同一プロファイル) を研究対象とした。この M 株は、疫学的関連は明らかではないが、日本全国に広まっていることからヒトからヒトへの感染性が高いと推定される。そこで NGS で全ゲノム解析を行った。M 株は北京型新興タイプの結核菌なので、この遺伝系統が共通でもつ SNP 部位を除き、M 株が特異的に持つ 100 箇所の 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 (*fadD25*、*fadB3*、*fadE17*、*ftsQ*、*kdtB*、*hsaD*) に注目して、抗酸菌内での過剰発現実験を行った。その結果、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。今後、この再現性とメカニズムを検討する必要がある。

A. 研究目的

結核菌が持つ病原性因子に関する報告が数多く存在している。しかし、結核菌の病原性を客観的に評価できる統一した方法

はなく、感染実験において動物生存数や感染臓器での残存菌数の比較等で評価されている。一般的に、ヒトに対して病原性が高いといわれる菌が持つ共通の性質として、ヒ

トからヒトに容易に感染が起り、免疫システムで排除されず、さらに発症までの期間が短いものなどが考えられる。つまり、結核感染事例で同一遺伝型株による感染者数が多い場合や疫学調査の結果により接触時間が短いと判明した場合などでは、注目している菌株は感染性が高いと考えることができる。また、分離された結核菌の遺伝型を IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析や反復配列多型 (VNTR) 分析法で調べると、疫学的リンクが明らかでないにも関わらず、多くの地域で特定の遺伝型の菌が見られる。そのような遺伝型の結核菌のひとつの例として、M 株が報告されている。M 株は、ストレプトマイシン耐性の北京型 (新興タイプ) 菌で関東南部に広まっていることが報告されている。また、神戸地区では最大クラスターを形成する結核菌と報告されている。このように、同じ遺伝型の結核菌が、全国的に広まっていることからヒトからヒトへの感染性が高いという性質を M 株は持っているとして推定される。そこで、全国から集めた M 株について次世代シーケンサー (NGS) で全ゲノム解析を行い M 株が独自に持つ一塩基多型 (SNP) を確認した。さらに、その中でも非同義置換 SNP を持つ遺伝子をリストアップした。このような変異を持った遺伝子が M 株の病原性に関与している可能性が高いと推定される。そこで、これらの遺伝子を *Mycobacterium bovis* BCG と *Mycobacterium smegmatis* で過剰発現させて抗酸菌の表現型が変化するかどうか確認した。

このように集団感染事例で感染力が高いと考えられる株を対象に、接触者調査で判明した疫学情報と NGS から得られた遺

伝型を比較することで、感染経路の推定に NGS が利用できるかどうか。また、検出された非同義置換を伴う SNP を指標として、ヒトからヒトへの感染性上昇に関与すると推定される遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

・分析に用いた結核菌株について

疫学調査により、本人 (Index case、9 月に登録) から 2 人の家族に感染が生じ発症した。それぞれの株は、M-1 (8 月登録)、S-1 (9 月登録) と表記した。また、もう 1 人の家族は QFT 陽性であり、潜在性結核感染症 (LTBI) として登録された。さらに Index case は、出張先の同僚と 3 回 (8 時間/回) 接触を持ち、この同僚も発症した (12 月登録、分離菌は T-1 と表記) (図 1)。Index case の菌も含めて菌が分離できた 4 株を解析した。

・菌株の遺伝子型

得られた 4 株の結核菌について、スポリゴタイプニング及び Large sequence polymorphisms (LSP) を調べた。LSP は、北京型結核菌の進化過程で、高頻度に欠損が生じることが知られている RD181 及び RD150 部位の有無を PCR 法で調べた。また、NTF 領域への IS6110 の挿入の有無を調べることで、祖先型か新興型かの同定を行った。

・反復配列多型 (VNTR) 分析

36 ローサイ (VNTRs-0424, 1955, 2074, 2163b, 2372, 3155, 3336, 4052, 4156, 2163a, 3232, 3820, 4120, 1612, 1895, 2401c, 2347, 3171, 3690, 1982 及び MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31,

MIRU 39, MIRU 40, ETR A, ETR B, ETR C, ETR F) について、VNTR 法で分離株のコピー数を調べた。

・M 株の収集と次世代シーケンサーによる分析

M 株は、大阪府 5 株、東京都 2 株、山形、沖縄県及び神戸市各 1 株の合計 10 株を選択し、次世代シーケンサー (NGS) で全ゲノム解析を行った。NGS 分析は、ペアエンドで 100-150bp の塩基配列を HiSeq 2000 (イルミナ社) で分析を行った。M 株結核菌の遺伝系統で共通に存在する SNP 部位を除き、H37Rv との塩基配列と異なる SNP 部位を Qiagen 社 CLC Genomics Workbench プログラムで抽出した。

・遺伝子発現プラスミドの構築

絞り込んだ 6 遺伝子 (*fadD25*, *fadB3*, *fadE17*, *ftsQ*, *kdtB*, *hsaD*) を *M. bovis* BCG ゲノムを鋳型として PCR 法で遺伝子を増幅して pVV16 プラスミド (大腸菌-抗酸菌シャトルベクター) に導入した。また、それぞれの遺伝子プラスミドは、サイトダイレクトミュータージェネシス法で M 株が持つ SNP 変異を導入したプラスミドを人工的に作成した。

・抗酸菌への作製プラスミドの導入

作製したプラスミドで *M. smegmatis* mc² 155 及び *M. bovis* BCG Tokyo をエレクトロポレーション (2,500V, 25uF, 1,000Ω) 法で形質転換し、各遺伝子の過剰発現株を分離した。培養は、カナマイシン (25ug/ml) 及び 10% オレイン酸-ブドウ糖-カタラーゼ (OADC) 含有 Middlebrook 7H10 寒天培地で培養を行った。また、菌に導入する各プラスミドは、予め 260nm の吸光度で DNA 濃度がほぼ同じになるように調整し

ておいた。*M. smegmatis* は 4 日後、*M. bovis* BCG は 3 週間後にコロニーの大きさやコロニー数を比較した。

C. 研究結果

1. 感染した株の遺伝子型

スポリゴタイピングで Index case を含めた 4 株の遺伝型を調べると、すべての株が北京型 (36 から 43 のダイレクトリピートがすべて陽性) であった。また、NTF 領域に IS6110 の挿入があり、世界的に広まっている新興型の結核菌だった。LSP 分析では、北京型結核菌で主流の RD181 領域を欠損した遺伝型であるが、さらに RD150 領域も欠損しており、日本国内の北京型結核菌ではマイナーな系統の株であることが確認できた。

2. 結核菌の型別分析

ハイパーバリアブル (HV) を含めた 36 ローサイについて、VNTR 法で 4 株のゲノム DNA を分析した。HV の 1 箇所 (VNTR-3232) を除き、他の 35 ローサイのコピー数はすべて 4 株間で一致した。この VNTR-3232 では、Index case、家族内感染例の M-1 株及び S-1 株のコピー数は 18 だったが、会社同僚の T-1 株では 14 で、コピー数が異なることが確認できた。

3. 全ゲノム解析

Index case、M-1、S-1 及び T-1 株について NGS で全ゲノム解析を行い 4 株間での SNP 部位とその数を調べた。SNP 部位として多型性の高い PE/PPE 遺伝子や Mycobacterium cell entry protein (*mce*) 遺伝子ファミリーのオープンリーディングフレーム (ORF) 中の変異は除いた。さらに、これらの株と同じ北京型新興型系統の結核菌が、共通に持