

201447006A

厚生労働科学研究委託費
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

非結核性抗酸菌症の疫学・診断・ 治療に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 阿 戸 学

平成27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費
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

非結核性抗酸菌症の疫学・診断・ 治療に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 阿 戸 学

平成27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（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）による委託業務として、阿戸 学が実施した平成26年度「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究

阿戸 学 1

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 本邦における肺非結核性抗酸菌症の疫学的実態に関する全国調査

御手洗 聡 9

2. 非結核性抗酸菌症の診断法開発と非結核性抗酸菌の病原性解析

松本 壮吉 15

3. 非結核性抗酸菌脂質に対する免疫応答に基づく診断法ならびに治療・予防法の確立

杉田 昌彦 21

4. 非結核性抗酸菌のマクロファージ内での生存戦略の解明

小出 幸夫 25

5. 肺非結核性抗酸菌症の臨床診断法の開発

肺 *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAC) 症の予後予測や病勢を評価出来る宿主側因子（血中指標）および菌側因子の探索

前倉 亮治 27

III. 学会等発表実績 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷・班会議プログラム等資料 33

I. 委託業務成果報告（総括）

非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究

業務主任者	阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部 部長
担当責任者	御手洗 聡	公益財団法人結核研究所抗酸菌部 部長
担当責任者	松本 壮吉	新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学分野・教授
担当責任者	杉田 昌彦	京都大学ウイルス研究所 教授
担当責任者	小出 幸夫	浜松医科大学 役職 理事・副学長
担当責任者	前倉 亮治	国立病院機構刀根山病院 副院長
研究協力者	小林 和夫	堺市衛生研究所
研究協力者	松本 真	大塚製薬微生物研究所
研究協力者	大原 直也	岡山大学大学院大学院医歯学総合研究科
研究協力者	星野 仁彦	国立感染症研究所ハンセン病研究センター
研究協力者	松村 隆之	国立感染症研究所 免疫部
研究協力者	岡部 真裕子	国立感染症研究所 免疫部
研究協力者	岩村 朋忠	神戸市環境保健研究所 感染症部
研究協力者	南宮 湖	慶應義塾大学医学部呼吸器内科
研究協力者	森本 耕三	公益財団法人結核研究所複十字病院呼吸器センター
研究協力者	倉島 篤行	公益財団法人結核研究所複十字病院呼吸器センター
研究協力者	長谷川 直樹	慶應義塾大学医学部感染制御センター
研究協力者	岡 真優子	京都府立大学生命環境学部
研究協力者	西内 由紀子	大阪市立大医学医学部 刀根山結核研究所
研究協力者	瀬戸 真太郎	浜松医科大学 感染症学
研究協力者	北田 清悟	国立病院機構刀根山病院

研究要旨：

非結核性抗酸菌（NTM）感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20%（世界：100-200 万人）を占め、日本では、年間 9000 人を越える新規患者が発生していると推定されている。非結核性抗酸菌症の罹患率の増加が懸念されているが、2007 年の調査以後の正確な疫学情報は存在しない。また、同症は易再発性で難治性であるため高い有病率も想定される。NTM 症感染症のコントロールに向けて、そこで、疾病の蔓延状況を把握するために、全国アンケート調査を行った結果、肺 NTM 症の推定罹患率は 15.3 人/10 万人年と推定され、2007 年の全国調査と比較して、約 2.7 倍に増加していた。

基礎研究成果として、抗酸菌に特徴的な細胞内寄生メカニズムの解析と非結核性抗酸菌の細胞壁糖脂質組成や宿主応答解析を行い、候補分子を同定した。今後、診断や治療への応用を検討する。

橋渡し研究成果として、より正確にかつ迅速に診断・治療を判断できる本症の診断薬を開発するため、NTM 特異タンパクを同定し、より正確にかつ迅速に診断・治療を判断できる本症の診断薬を開発に資するとともに、臨床経過が安定した例と悪化例を抽出し、病勢の進行を予測できる血清学的マーカーの探索を開始した。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20% (世界: 100-200 万人) を占め、日本では、年間 9000 人を越える新規患者が発生していると推定されている。非結核性抗酸菌症の罹患率の増加が懸念されているが、2007 年の調査以後の正確な疫学情報は存在しない。また、同症は易再発性で難治性であるため高い有病率も想定される。そこで、疾病の蔓延状況を把握するために、アンケート調査に加え、海外では主流である抗酸菌検査データ分析の手法も導入し、患者構成や菌種分布の地域差等も明確化することで、本症の実態を把握する。

NTM 感染症の中でも、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。アメリカ合衆国胸部疾患学会および感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致した活動性 MAC 感染症に関し、感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 核抗原に対する血清 IgA 抗体検出の診断キットを開発した。国内検体では診断感度: 84%、特異度: 100%、また、所要時間は 3 時間 (従来法では約 1 か月) であり、高い臨床的有用性を示す。厚生労働省は体外診断用医薬品製造販売承認し、保険医療品目として収載され (2011 年 8 月)、2012 年 9 月から民間検査機関 (BML) の受託項目となり、保険診療として広く普及している。この診断法開発のノウハウを生かして、肺 MAC 症の予後予測や病勢を評価出来る血中指標の探索、および MAC 菌のゲノム多様性と肺 MAC 症の臨床像との関連性の検討を加味しつつ、より正確にかつ迅速に診断・治療を判断できる本症の診断薬を開発する。本症に対する診断薬作製に関する基礎研究で得られる知見を元に、薬剤耐性のメカニズムを解明し、革新的な治療薬の開発につなげる。

本症は、再発が多いがその機構は不明である。再発防止策の提案を目的として、初発と再発時の菌層を解析し、再発事例における内因性再燃と再感染の実態を明らかにする。抗酸菌に特徴的な細胞内寄生メカニズムの解析と非結核性抗酸菌の細胞壁糖脂質組成や宿主応答解析を行い、その診断や予防への応用を実施する。

B. 研究方法

1. 非結核性抗酸菌症の疫学調査

a) 医療施設調査

日本呼吸器学会認定施設・関連施設 (873 施設) に、2014 年 1 月から 3 月までの肺 NTM 症と結核症の新規診断数を記入するアンケート調査を実施した。全数把握対象疾患である結核症の新規診断数と、肺 NTM 症の新規診断数の比率から、肺 NTM 症の罹患率の算出を目指した。回答方法に関しては①郵送による回答、②インターネット (web) による回答、③FAX による回答を提示し、いずれの方法においても回答可能とした。

b) 検査施設調査

抗酸菌検査を受託している主要な衛生検査所 (検査センター) に対して、非結核性抗酸菌の分離状況等に関するデータ提供が可能かどうか予備調査を実施した。

2. 非結核性抗酸菌症の診断法開発と非結核性抗酸菌の病原性解析

a) 非結核性抗酸菌蛋白質の抽出とプロテオミクス解析

Mycobacterium smegmatis, *Mycobacterium smegmatis* MDP1-KO (*Hyg*^r), および MDP1 補填株 *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* 104 を 7H9-ADC 培地にて培養し、集菌後タンパクを抽出し、二次元電気泳動と Triple TOF によるプロテオミクス解析に試供した。

b) 非結核性抗酸菌症患者血清の抗体応答検出
M. avium subsp. *Hominissuis* 蛋白質を抽出後、SDS-PAGE にて展開し、PVDF 膜に転写した。膜をブロッキング後、1% スキムミルクにて希釈した非結核性抗酸菌症患者 3 名分の血清と反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体で反応させ、再度洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagents を加え、発光を WSE-6100 LuminoGraph ルミノグラフにて検出した。

3. 非結核性抗酸菌脂質に対する免疫応答に基づく診断法ならびに治療・予防法の確立

M. avium (serovar 4) (以下 MAC と記載)あるいは BCG ワクチン株 (Tokyo 172 株を用い、7H9 液体培地で培養した。菌体脂質は、クロロホルム/メタノールで抽出し、総脂質画分を薄層クロマトグラ

フィーにより展開し、GMM を含んだ分画を単離精製した。得られた GMM を、ステアリン酸付加オクタアルギニンを含むリポソームに封入した。

Hartley モルモットに、MAC 生菌あるいは相当する加熱処理死菌を接種し、6 週後に GMM 含有リポソームあるいはコントロールリポソームを皮内接種した。以後経時的に皮膚硬結径を測定した。さらに所属リンパ節を回収して細胞を単離し、GMM リポソーム (1 mg/ml) 存在下で培養した。18 時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータル RNA を単離した。さらに常法に従い、RT-PCR 法でサイトカイン mRNA 量を測定した。

4. 非結核性抗酸菌のマクロファージ内での生存戦略の解明

MAC 感染マクロファージで発現しているタンパク質を結核菌感染マクロファージと比較して、MAC 感染によって特異的に発現が増加、減少する宿主タンパク質をプロテオミクス的手法を用いて同定した。RAW264.7 マクロファージに BCG、結核菌、MAV 104 株を感染させて、感染 24 時間後にマクロファージ細胞抽出液を得た。この抽出液をトリプシン処理した後、LC-MS/MS によって網羅的タンパク質同定を行った。タンパク質発現量はペプチドスペクトル量で比較した。

⑤肺非結核性抗酸菌感染に対する臨床診断法の開発

2006 年から 2014 年まで当院において肺 MAC 症と診断され、キャピリア[®]MAC により MAC 抗体が測定されていた 822 例のうち、3 年以上定期的に経過観察された 299 例を対象とした。これらの症例を経過観察例と化学療法施行例の 2 つに大別し、さらに治療介入とその効果を加味し後方視的に分類を行った。299 例から臨床経過が安定した例 (Stable A1) と悪化例 (Progressive C および MAC による死亡例) に分けて抽出した。

倫理面への配慮

国立病院機構刀根山病院で人検体を用いた研究計画書の倫理申請を行い、研究を行った。本研究は、生命倫理、動物愛護、遺伝子組換え実験、安全対策の観点から、所属機関で定められた規定に則り、機関での承認を得て実施された。申告すべき利益相反はなかった。

C. 研究成果

1. 非結核性抗酸菌症の疫学調査

a) 医療機関調査

回収率は 2015(平成 27)年 1 月 17 日現在、61.3%(暫定値) で、同期間中の新登録結核の診断数は 2,253 例であったのに対し、肺 NTM 症の診断数は 2,612 例であった。同期間の新登録結核年換算罹患率は 12.9 人/10 万人年であり、肺 NTM 症の推定罹患率は 15.3 人/10 万人年と推定され、2007 年の全国調査と比較して、約 2.7 倍に増加した。同様の算出方法から、肺 MAC 症・肺 *M. kansasii* 症・肺 *M. abscessus* 症の罹患率は、それぞれ、13.9 人/10 万人年・0.7 人/10 万人年・0.5 人/10 万人年と推定された。

地域別の回答対象病院回収率は、関東・九州・沖縄で高く、東北・中国で低い傾向にあった。また、地域別の肺 NTM 症の罹患率は、東北・近畿で高く、沖縄で低い傾向であった。

肺 NTM 症の内、90%以上が肺 MAC 症を占め、地域別には近畿・九州、沖縄でやや肺 MAC 症の比率が低い傾向にあった。肺 MAC 症で菌種が同定されている症例のうち、肺 *M. avium* 症と肺 *M. intracellulare* 症の割合は、顕著な地域差が見られ、肺 *M. intracellulare* 症の占める割合は「西高東低」(もしくは南高北低) の傾向を示した。肺 *M. kansasii* 症・肺 *M. abscessus* 症に関しては、近畿において各々 1.2 人/10 万人年および 1.0 人/10 万人年と、他の地域に比較して高い傾向を示した。

b) 衛生検査所調査

主要検査センターに対して抗酸菌検査に関する情報の提供が可能かどうか調査を依頼した。基本的に個人情報と連結しない形で分離地域や分離菌の情報を提供することは可能と判断された。それに基づいて標準的データシートの作成を行った。

2. 非結核性抗酸菌症の診断法開発と非結核性抗酸菌の病原性解析

a) 蛋白質の抽出とプロテオミクス解析 非結核性抗酸菌のプロテオミクス解析の立ち上げと MDP1 による遺伝子発現調節の解析

二次元電気泳動と質量分析による、非結核性抗酸菌関連プロテオミクス解析系の立ち上げを行った。非結核性抗酸菌の弱毒非結核性抗酸菌で

ある *M. smegmatis*、および結核菌で増殖制御や持続性感染に関わることが判明している MDP1 の欠失株、およびその入れ戻し株を用いて、プロテオミクス解析系の構築にあわせて MDP1 の支配下にある遺伝子発現を観察した。3 菌株の抽出蛋白質量の測定から、まず、MDP1 欠失株で、抽出蛋白質量が多いことが判明した。次に *M. smegmatis* 3 株由来蛋白質を、二次元電気泳動で解析した結果、欠失株と野生株・補填株で異なる量を示す 73 蛋白質スポットを検出した。その中で、3 倍以上量比の異なる 24 の蛋白質スポットについて、ペプチドの質量分析—マスコットによるデータベースマッチングを行った。解析の結果から、DNA や蛋白質合成関連遺伝子、酸化還元酵素類、トランスポーター、脂質合成酵素、シャペロンの発現量が、欠失株で 3 倍以上上昇していることが判明した。

M. smegmatis を用いて確立した系を用いて、*M. avium* subsp. *Hominissuis* の蛋白質発現を解析した。*M. avium* 104 株を 7H9-ADC 培地で培養し、増殖期と静止期の菌を得て、蛋白質を抽出後、二次元電気泳動で解析した。その結果、増殖期と静止期で顕著に発現量が異なる 12 の蛋白質スポットを検出した。現在、この 12 スポットの同定を行っている。

b) 非結核性抗酸菌症患者血清の抗体応答検出

上記のプロテオミクスによる抗原の同定系の確立をうけ、実際の非結核性抗酸菌症患者において、*M. avium* subsp. *Hominissuis* 由来蛋白質に反応する抗体が産生されているかをウエスタンブロット法で確認した。国立病院機構刀根山病院で入院・通院する患者由来血清とツベルクリン反応陰性者由来血清を対照として試験を行った。その結果、ツベルクリン反応陰性者では反応しないが、患者血清を 3,000 倍以上希釈しても反応する複数の蛋白質が存在することを見いだした。現在、これらのスポットについてプロテオミクス解析による同定を進めている。上記の結果に加え、新しい非侵襲的な診断法の開発を目指し、尿中の疾患特異的マーカーの検出を目指している。本年度は、国立病院機構刀根山病院の患者尿サンプルの収集を開始した。

播種性の非結核性抗酸菌症患者では、IFN-gamma シグナリングを阻害する抗体が産生

されていることが知られており、患者では細胞レベルで STAT1 のリン酸化が生じない。従って血中の STAT1 リン酸化を阻害する自己抗体の有無で、播種性非結核性抗酸菌症を診断できる可能性がある。レポーター遺伝子を用いた新規診断法の開発が、新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸器・感染症内科学 坂上拓郎 博士等により進められている。

c) 非結核性抗酸菌のバイオフィーム形成機構の解析

M. avium subsp. *Hominissuis* のバイオフィーム形成について解析し、低栄養よりも富栄養下、低酸素下においてバイオフィーム形成を行うことを明らかにしている。

3. 非結核性抗酸菌脂質に対する免疫応答に基づく診断法ならびに治療・予防法の確立

GMM を産生しない MAC 菌の適切な培養条件の決定

0.2% のグルコースを含む 7H9 に市販の ADC エンリッチメントを添加した標準人工培地で MAC を培養した場合、顕著な GMM 産生が検出された。ついで炭素源であるグルコースをグリセロールに代え培養を試みた。その結果、MAC 菌は順調に生育し、GMM を産生しないことが確認された。

MAC 生菌感染あるいは死菌感作モルモットにおける GMM 皮内テスト

モルモットに MAC 生菌、または比較対象として加熱処理 MAC 死菌を接種した。6 週後に GMM リポソームおよびコントロールリポソームを接種し、経時的に硬結径をモニターしたところ、MAC 生菌接種個体においては GMM に対する特異的組織応答が認められたのに対し、MAC 死菌接種個体においては GMM 応答が検出されなかった。このことから、GMM を産生していなかった MAC 生菌が、生体内において GMM を新生し、GMM 特異的 T 細胞応答が誘起されたと結論づけた。

リンパ節における GMM 特異的応答の検出

MAC 生菌接種個体よりリンパ節細胞を単離し、GMM 刺激を行ったのちトータル RNA を抽出した。これを鋳型とし、各種サイトカインプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、GMM 抗原

刺激により IL-10 の特異的発現増強が観察された。

4. 非結核性抗酸菌のマクロファージ内での生存戦略の解明

RAW264.7 マクロファージに BCG、結核菌、*M. avium* subsp. *Hominissuis* 104 株を感染させて、マクロファージ細胞抽出液を得た。この抽出液をトリプシン処理した後、LC-MS/MS によって網羅的タンパク質同定を行った。その結果、LC-MS/MS によって 3465 タンパク質を同定することができた。BCG、結核菌、MAC 感染の全てで発現が上昇するが、特に MAC 感染で発現が上昇したタンパク質として、sequestosome-1 (p62)、Cis-aconitate decarboxylase (CAD)、myosin-Ig が見つかった。

5. 肺非結核性抗酸菌感染に対する臨床診断法の開発

Stable A1 : 5 年以上の経過観察で胸部画像所見の著明な悪化が認められない無治療もしくは単剤投与の症例 50 例と、Progressive C : 多剤併用化学療法を複数回施行するも、排菌陰性化せず、胸部画像所見が悪化もしくは死亡した症例 40 例を抽出した。今後これらの症例において血清・尿検体を用いたバイオマーカーを測定し、その差異につき比較検討を行う。また、起因菌のゲノム多様性と肺 MAC 症の臨床像との関連性についても検討する。

D. 考察

過去の非結核性抗酸菌症研究協議会による調査では回答回収率が約 20-25%であったことと比較すると、本全国調査では回収率が 61.3%と 6 割を超え、従来の全国調査より極めて高い回収率を達成し、信頼度の高い結果を得ることができた。

本調査により、肺 NTM 症の罹患率は 15.3 人/10 万人年と算出され、2007 年の全国調査と比較して、2.7 倍の罹患率となったことが明らかとなった。2014 年度の結核の罹患率の最終報告は、現時点で確定していないが、肺 NTM 症の罹患率は、結核の罹患率を超えていることが予想された。結核症は標準的治療により、その大多数が治癒可能であるのに対し、肺 NTM 症は現時点において、治癒可能な治療法が存在しないため、有病率は結核よりもさらに高くなっていることが予想される。肺 NTM 症が社会に及ぼす疾病負荷は既に十分に高

いと考えられ、肺 NTM 症の詳細な有病率を含めた実態把握及び新たな肺 NTM 症に対する対策は今後の重要な課題である。

また、肺 NTM 症の地域間罹患率に関して、東北では、他の地域に比較して、著しく罹患率が高かった。本調査においては、東北地方において結核床を有する病院からの回収率の低さがバイアスとなり、肺 NTM 症の罹患率が高く算出されてしまった可能性が考えられた。そのため、回収率の低かった地域を中心に、結核床を有する回答施設に改めて回答を促す連絡を行い、より正確な罹患率の把握に努めている現況である。

また、本全国調査では、肺 NTM 症のうち肺 MAC 症の占める割合は 90%以上を占めており、公衆衛生上、まずは肺 MAC 症の実態をさらに詳細に把握することが重要であることが示された。肺 MAC 症の内、*M. avium* に対して *M. intracellulare* の占める割合は、「西高東低」(南高北低)の傾向を示した。この要因は不明である。

肺 *M. kansasii* 症に関しては、近畿で罹患率が高い傾向にあったが、罹患率は微増に留まっていた。肺 *M. abscessus* 症の罹患率は、2007 年の 0.1 人/10 万人年から 0.5 人/10 万人年と大幅な増加を認めており、今後の実態把握及び対策が急務であると考えられた。近年 *M. abscessus* とされていた菌の中には、治療反応性の異なる *M. masillense* や *M. bolletii* が含まれていることが判明している。本全国調査では、MAC・*M. kansasii*・*M. abscessus* 以外の希少な肺 NTM 症の菌種に関しては回答対象としなかったが、今回予備調査を行った検査センターサーベイからのデータを活用することで、およそその罹患率を算出することが可能であり、来年度以降の研究課題になると考えられた。

非結核性抗酸菌症の新規診断法の確立を目指し、初年度である平成 26 年度は、新規診断抗原の同定にたえうる非結核性抗酸菌蛋白質のプロテオミクス解析系の立ち上げを行った。また、抗酸菌の持続性感染に関与すると推定される MDP1 の支配遺伝子を解析し、MDP1 の支配下には、DNA 合成—蛋白質合成系の他に、レドックス遺伝子の発現を抑制していることが判明した。さらに実際の非結核性抗酸菌症患者由来の血清を用いて、非結核性抗酸菌症患者の抗血清が反応する菌由来蛋白質の存在を確認した。現在、患者検体数

を増やし、患者血清が広く特異的に反応するスポットの特定を進め、主要蛋白質抗原の同定と診断キットの原型を作成したい。

結核菌に比して MAC 菌においては、感染前には GMM を産生しないこと、しかしグルコース存在下での GMM 産生能力が極めて高いことから、GMM に対する T 細胞応答が感染成立の鋭敏な生物学的指標になると考えられる。次年度の課題として

1) 生体内増殖 MAC 菌が真に GMM を新生することの実証

2) 臨床展開を視野に、GMM 特異的 T 細胞応答をより鋭敏かつ簡便に検出する方法の確立

1) については、MAC 菌感染組織より脂質を抽出し、LC-MS による GMM の検出を行う予定である。に取り組むことが肝要と考える。

MAV 感染時において、結核菌感染、BCG 感染時よりも発現量が増加するタンパク質を見出すことができた。p62 は選択的オートファジーを誘導するタンパク質であり、CAD はイタコン酸を合成して、抗酸菌の殺菌作用に機能することが明らかになっている。Mycosin-Ig はマイナー組織適応抗原である HA-2 のプレカーサーであり、これらのマーカーを標的とした新しい MAC 感染症治療方法の開発に発展する可能性がある。

E. 結論

- 肺 NTM 症の推定罹患率は 15.1 人/10 万人と算出され、過去 7 年間で約 2.7 倍に増加し、公衆衛生上、重要な感染症であると考えられた。
- 新規非結核性抗酸菌感染症の診断法確立を目指し、非結核性抗酸菌のプロテオミクス解析系を確立した。
- MDP1 は、非結核性抗酸菌においても、静止期において、多数の蛋白質発現を制御しており、特に持続性感染との関連性が示唆された。
- 予備試験において、非結核性抗酸菌感染症患者中の抗血清が反応する蛋白質抗原の存在を確認した。

- MAC 感染により GMM が新生され、GMM 特異的 T 細胞応答が誘起されることを実証した。
- MAV 感染マクロファージにおいて発現が増加するタンパク質をプロテオミクスによって同定することができた。
- 肺 MAC 症患者 299 例中横断的解析にて、5 年以上の経過観察で胸部画像所見が安定していた安定例 50 例 (16.7%) と複数回の多剤併用化学療法に反応せず病状が悪化する悪化例 40 例 (13.4%) が存在した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rinchai D, Riyapa D, Buddhisa S, Utispan K, Titball RW, Stevens MP, Stevens JM, Ogawa M, Tanida I, Koike M, Uchiyama Y, Ato M*, Lertnemonkolchai G*. Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy*. in press.

2. 学会発表

【国内会議】

- 1) Honda N, Sato N, Ato M, Matsumura T, Yamazaki T, Sekizuka T, Kuroda M, Fujimoto H, Kato A, Ohara N. A single base insertion in 16S rRNA gene confers Streptomycin dependence in *Mycobacterium bovis* BCG. 第 88 回日本細菌学会総会 (2015 年 3 月、岐阜)
- 2) 趙娜、中山真彰、関塚剛史、黒田誠、本田尚子、阿戸学、中島千絵、鈴木定彦、大原直也 抗酸菌におけるパラアミノサリチル酸に対する新たな耐性機序の可能性 第 88 回日本細菌学会総会 (2015 年 3 月、岐阜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

第26回 慶應医師会 市民公開講座

近年、増加する 肺非結核性抗酸菌症

3/6

2015

[金] 18:00~19:30

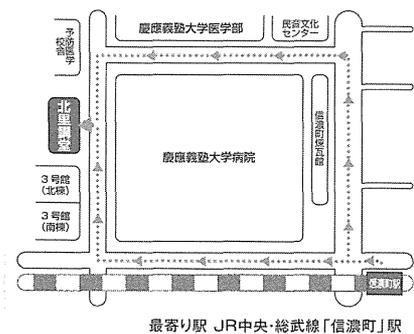
参加費
無料

事前
申し込み
不要

先着
400名

プログラム

挨拶	鈴木 則宏 慶應医師会 会長 慶應義塾大学医学部 神経内科 教授
座長	長谷川 直樹 慶應義塾大学医学部 感染制御センター 教授
演題 演者	1. 18:05~18:25 肺非結核性抗酸菌症の概要 南宮 湖 慶應義塾大学医学部 呼吸器内科 助教
	2. 18:25~18:45 肺非結核性抗酸菌症の薬と副作用 倉島 篤行 結核予防会 複十字病院 臨床研究アドバイザー
	3. 18:45~19:05 肺非結核性抗酸菌症患者さんの QOL (Quality of Life;生活の質) について 長谷川 直樹 慶應義塾大学医学部 感染制御センター 教授
	4. 19:05~19:25 パネルディスカッション
閉会の辞	岩田 敏 慶應義塾大学医学部 感染学教室 教授



会場 北里講堂

慶應義塾大学医学部
北里記念医学図書館2階
東京都新宿区信濃町35番地

II. 委託業務成果報告（業務項目）

本邦における肺非結核性抗酸菌症の疫学的実態に関する全国調査

担当責任者 御手洗聡 公益財団法人結核研究所抗酸菌部 部長
研究協力者 南宮湖 慶應義塾大学医学部呼吸器内科 助教
研究協力者 森本耕三 公益財団法人結核研究所複十字病院呼吸器センター 専門役
研究協力者 星野仁彦 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長
研究協力者 倉島篤行 公益財団法人結核研究所複十字病院呼吸器センター 臨床研究アドバイザー
研究協力者 長谷川直樹 慶應義塾大学医学部感染制御センター 教授

研究要旨：

近年、本邦における肺非結核性抗酸菌（NTM）症の増加が指摘されている。本症に関する過去の全国調査は、結核との罹患率を比較する方法で、国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班による調査や非結核性抗酸菌症研究協議会による全国調査が実施されてきた。しかし、肺 NTM 症の推定罹患率が 5.7 人/10 万人と算出された 2007 年の全国調査を最後に、近年の肺 NTM 症の疫学的実態は不明であった。そこで日本呼吸器学会認定施設・関連施設（873 施設）に、2014 年 1 月から 3 月までの肺 NTM 症と結核の新規診断数を記入するアンケート調査を実施した。回収率は 61.3%で、同期間中の新登録結核の診断数は 2,253 例であったのに対し、肺 NTM 症の診断数は 2,612 例であった。同期間の新登録結核年換算罹患率は 12.9 人/10 万人年であり、肺 NTM 症の推定罹患率は 15.3 人/10 万人年と推定され、2007 年の全国調査と比較して約 2.7 倍に増加していた。肺 MAC 症が 90.4%と大多数を占め、その内訳は東日本では *M. avium* が 75.3%、*M. intracellulare* が 24.7%であるのに対し、西日本では *M. avium* が 57.2%、*M. intracellulare* が 42.8%であった。また、肺 *M. kansasii* 症の推定罹患率は 0.7 人/10 万人年、肺 *M. abscessus* 症の推定罹患率は 0.5 人/10 万人年と算出された。肺 NTM 症の推定罹患率は 15.3 人/10 万人年と算出され、過去 7 年間で 2.7 倍に増加し、公衆衛生上、重要な感染症であると思われた。

A. 研究目的

疾病に対する多面的な対策を取る上で、その基礎となる疫学情報は必須である。肺非結核性抗酸菌（NTM）症は、近年、その罹患率の増加が臨床現場で懸念されており、森本らによる本邦における肺 NTM 症の死亡率・有病率に関する報告においても、その経年的な増加が指摘されている（Morimoto K et al, Ann Am Thorac Soc

2014; 11: 1)。しかし、肺 NTM 症の罹患率に関して、2007 年の非結核性抗酸菌症研究協議会による全国調査以後、本邦において疫学調査は実施されておらず、近年の肺 NTM 症の疫学的実態は不明である。

そこで、本研究班では、肺 NTM 症の疫学的実態を明らかにすることを目的に、全国調査を計画・実施した。

B. 研究方法

①医療機関調査

日本呼吸器学会認定施設・関連施設（873施設）に、2014年1月から3月までの肺NTM症と結核症の新規診断数を記入するアンケート調査を実施した。結核症は、全数把握対象疾患であり、「結核の統計」によりその新規罹患数を把握することが可能である。結核症の新規診断数と肺NTM症の新規診断数の比率から、肺NTM症の罹患率の算出を目指した。肺NTM症の内、菌種別には、肺 *Mycobacterium avium* 症、肺 *Mycobacterium intracellulare* 症、肺 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症、肺 *Mycobacterium kansasii* 症、肺 *Mycobacterium abscessus* 症の内訳に関する回答項目を作成し、その他の希少な肺NTM症の菌種に関しては、今回の回答対象から除外した。

回答方法に関しては①郵送による回答、②インターネット（web）による回答、③FAXによる回答を提示し、いずれの方法においても回答可能とした。

尚、実際に各医療機関に送付した用紙は、別紙（参考資料1-7）の通りとなっている。

②衛生検査所調査

抗酸菌検査を受託している主要な衛生検査所（検査センター）に対して、非結核性抗酸菌の分離状況等に関するデータ提供が可能かどうか予備調査を実施した。

C. 研究結果

①医療機関調査

回収率は2015年1月17日現在、61.3%（暫定値）で、同期間中の新登録結核の診断数は2,253例で、あったのに対し、肺NTM症の診断数は2,612例であった。同期間の新登録結核年

換算罹患率は12.9人/10万人年であり、肺NTM症の推定罹患率は15.3人/10万人年と推定され、2007年の全国調査と比較して、約2.7倍に増加した。同様の算出方法から、肺MAC症・肺 *M. kansasii* 症・肺 *M. abscessus* 症の罹患率は、それぞれ、13.9人/10万人年・0.7人/10万人年・0.5人/10万人年と推定された。

地域別の回答対象病院数・回収率は、それぞれ、北海道が34病院（55.9%）、東北が30病院（49.2%）、関東が262病院（69.5%）、中部が145病院（58.5%）、近畿が143病院（55.9%）、中国が61病院（45.9%）、四国が41病院（51.2%）、九州が124病院（63.7%）、沖縄が13病院（76.9%）となり、回収率に関しては、関東・九州・沖縄で高く、東北・中国で低い傾向にあった。

地域別の肺NTM症の罹患率（図1）は、北海道が14.3人/10万人年、東北が26.7人/10万人年、関東が15.6人/10万人年、中部が12.4人/10万人年、近畿が19.7人/10万人年、中国が14.0人/10万人年、四国が11.3人/10万人年、九州が14.8人/10万人年、沖縄が9.8人/10万人年と推定され、東北・近畿で高く、沖縄で低い傾向であった。

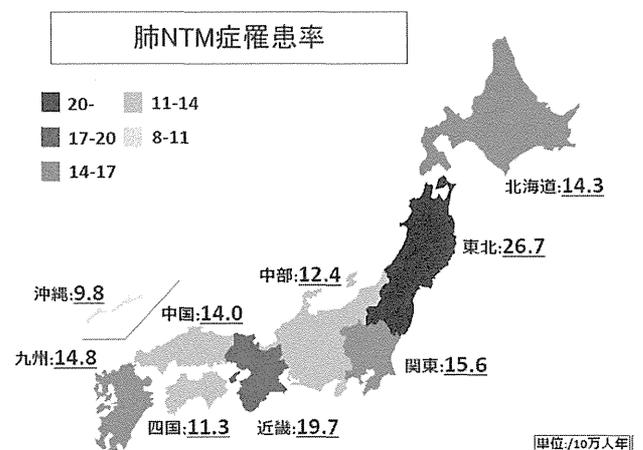


図1 肺NTM症の地域別推定罹患率

肺NTM症の内、90%以上が肺MAC症を占め、地域別には、北海道が89.2%、東北が94.6%、関東が89.2%、中部が91.3%、近畿が84.6%、

中国が 91.3%、四国が 94.2%、九州が 86.2%、沖縄が 85.7%と、近畿・九州、沖縄でやや低い傾向にあった（図 2）。

肺 MAC 症の内、*M. avium* もしくは *M. intracellulare* の菌種が判明している中で、肺 *M. avium* 症と肺 *M. intracellulare* 症の割合には、顕著な地域差が見られた（図 3）。具体的には、菌種が判明している肺 MAC 症の内、肺 *M. intracellulare* 症の占める割合は、地域別には、北海道が 11.1%、東北が 24.6%、関東が 23.5%、中部が 30.9%、近畿が 36.6%、中国が 39.1%、四国が 49.1%、九州が 59.7%、沖縄が 66.7%と、「西高東低」（もしくは南高北低）の傾向を示した。

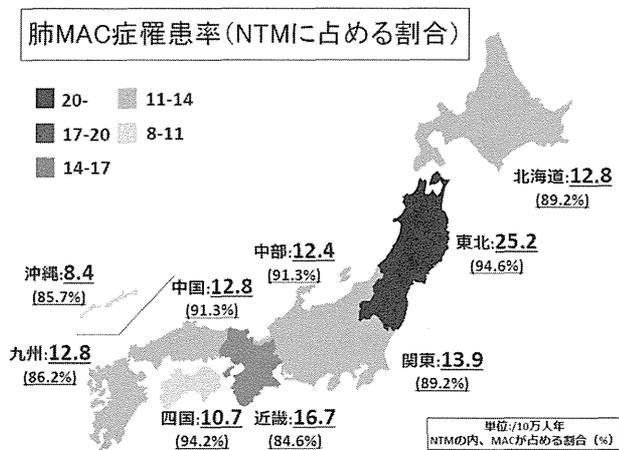


図 2 肺 MAC 症の地域別推定罹患率と NTM 症における割合

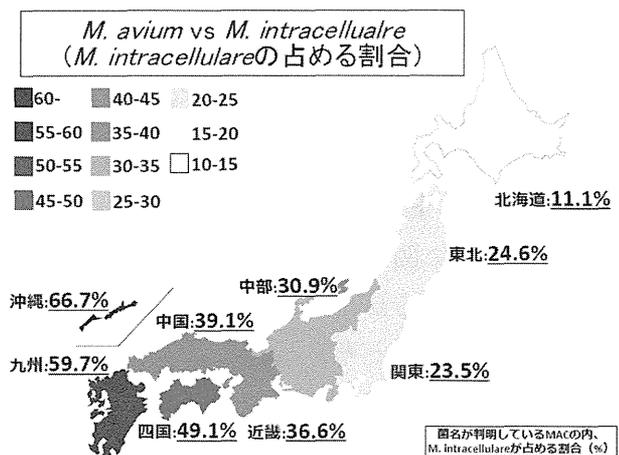


図 3 肺 MAC 症における *M. avium* と *M.*

intracellulare の割合 (*M. intracellulare* の占有率)

肺 *M. kansasii* 症・肺 *M. abscessus* 症に関しては、近畿において各々 1.2 人/10 万人年および 1.0 人/10 万人年と、他の地域に比較して高い傾向を示した。

本全国調査による結核の報告数は 2,612 例であり、結核予防会結核研究所疫学情報センターの「結核の統計」結核登録者情報調査月報報告によると、2014 年 1 月から 3 月までの新登録結核患者数は 4,113 例であるため、54.5%と半数以上の新登録結核患者の集計に至った。

②衛生検査所調査

主要検査センター 3 社（エスアールエル、ビー・エム・エル、LSI メディエンス）に対して抗酸菌検査に関する情報の提供が可能かどうか調査を依頼した。基本的に個人情報をつながない形で分離地域や分離菌の情報を提供することは可能と判断された。それに基づいて標準的データシートの作成を行った。

D. 考察

2001 年の非結核性抗酸菌症研究協議会による調査では回答回収率が約 25%であり、2007 年の非結核性抗酸菌症研究協議会による調査では回答回収率が 19.9%であったことと比較すると、本全国調査では回収率が 61.3%と 6 割を超え、従来の全国調査より極めて高い回収率を達成することができた。アンケート回答による疫学調査では、その回収率が成功の可否を握ると考えられ、その点において、本全国調査は成功に至ったと考えられる。

高い回収率を達成し得た要因としては、下記の要因が考えられた。

- 1) 回答方法の多様化（郵送, web, FAX）により、回答担当者がより容易に回答することができた。
- 2) 質問用紙（参考資料）を簡素化することに

より、回答担当者の負担を軽減することが可能となった。

- 3) 「Q&A」(参考資料)の作成による回答に関する疑問点を解決することを図った。
- 4) 関係学会(日本呼吸器学会・日本結核病学会)からの調査依頼状及び厚生労働省健康局結核感染症課からの事務連絡を同封することにより、回答への啓蒙を図った(参考資料)。
- 5) 事務局の連絡先を明示し、各施設において、回答に関する疑問点が生じ、事務局に問い合わせが来た場合に、迅速に対応する等、事務局機能の強化を図った。

今後、同様の全国調査を将来的に実施する場合に、本全国調査で得られたノウハウを生かしていくことが肝要であると考えられた。

本調査により、肺 NTM 症の罹患率は 15.3 人/10 万人年と算出され、2007 年の全国調査と比較して、2.7 倍の罹患率となったことが明らかとなった。2014 年度の結核の罹患率の最終報告は、現時点で確定していないが、肺 NTM 症の罹患率は、結核の罹患率を超えていることが予想された。

肺 NTM 症の罹患率が結核の罹患率を超えつつあることは、多くの臨床医が臨床現場で実感していることであり、初めてデータにより裏付けられたと言える(図 4)。結核症は標準的治療により、その大多数が治癒可能であるのに対し、肺 NTM 症は現時点において、治癒可能な治療法が存在しないため、有病率は結核よりもさらに高くなっていることが予想される。これは、森本らの死亡率・有病率に関する先行研究を支持するものである。一般的に、罹患率は疾病のリスクに呼応するのに対し、有病率は社会における疾病負荷に呼応すると考えられており、肺 NTM 症が社会に及ぼす疾病負荷は既に十分に高いと考えられ、肺 NTM 症の詳細な有病率を含めた実態把握及び新たな肺 NTM 症に対する対策は今後の重要な課題である。

また、肺 NTM 症の罹患率に関して、地域間の相違が見られた。東北及び近畿で罹患率が高い傾向にあったのに対し、沖縄では罹患率が低い傾向にあった。東北では、他の地域と比較して、著しく罹患率が高かった。先行研究の 2007 年の非結核性抗酸菌症研究協議会による全国調査でも、東北における非結核性抗酸菌の分離頻度は、他の地域と比較して高い傾向にあった。しかし、本調査においては、東北地方において結核床を有する病院からの回収率の低さがバイアスとなり、肺 NTM 症の罹患率が高く算出されてしまった可能性が考えられた。具体的には、非結核性抗酸菌症研究協議会による全国調査及び本全国調査では、共に、結核の罹患率と比較する形で肺 NTM 症の罹患率を算出する方法を採用したため、多くの結核患者が集積し、より多くの新規登録結核患者数を報告する結核床を有する施設からの回収率が低下すると、そこから算出されてくる肺 NTM 症の罹患率は高く見積もられてしまうバイアスが考えられた。そのため、当研究班では、回収率の低かった地域を中心に、結核床を有する回答施設に改めて回答を促す連絡を行い、より正確な罹患率の把握に努めている現況である。

また、本全国調査では、肺 NTM 症のうち肺 MAC 症の占める割合は 2007 年の全国調査と同様に 90%以上を占めており、公衆衛生上、まずは肺 MAC 症の実態をさらに詳細に把握することが重要であることが示された。肺 MAC 症の内、*M. avium* と *M. intracellulare* の占める割合に関して、大変興味深いデータが得られた。2007 年の全国調査と同様に、肺 *M. intracellulare* 症の割合は、「西高東低」(南高北低)の傾向を示した。この要因に関する詳細は不明であるが、地理的要因・気候的要因などの環境因子に関する研究が今後は必要と考えられた。

肺 *M. kansasii* 症に関しては、非結核性抗酸菌症研究協議会による調査と同様に、近畿で罹患率が高い傾向にあった。肺 MAC 症及び肺 *M.*

abscessus 症の近年の罹患率の増加が著しかったのに対し、肺 *M. kansasii* 症の罹患率は微増に留まっていた。

肺 *M. abscessus* 症の罹患率は、2007 年の 0.1 人/10 万人年から 0.5 人/10 万人年と大幅な増加を認めており、今後の実態把握及び対策が急務であると考えられた。近年 *M. abscessus* とされていた菌の中には、治療反応性の異なる *M. masillense* や *M. bolletti* が含まれていることが判明している。本邦において、*M. abscessus* から *M. masillense* や *M. bolletti* を鑑別できる施設は非常に限られているため、本全国調査では、*M. masillense* や *M. bolletti* を含めた肺 *M. abscessus* 症の記入を回答施設に依頼した。これらの菌種間では、治療反応性が異なるという臨床的重要性が存在するため、今後はこれらを区別した疫学データの集積が望ましい。

本全国調査では、MAC・*M. kansasii*・*M. abscessus* 以外の希少な肺 NTM 症の菌種に関しては回答対象としなかったが、今回予備調査を行った検査センターサーベイからのデータを活用することで、おおよその罹患率を算出することが可能であり、来年度以降の研究課題になると考えられた。

E. 結論

肺 NTM 症の推定罹患率は 15.1 人/10 万人と算出され、過去 7 年間で約 2.7 倍に増加し、公衆衛生上、重要な感染症であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 森本耕三. 2015. 肺非結核性抗酸菌症の疫学. 呼吸器内科. 27(1); 1-7.

2. 学会発表

【国内会議】

- 1) 倉島篤行. NTM の疫学 (シンポジウム) 第 90 回結核病学会総会 長崎 2015 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肺非結核性抗酸菌症の罹患率年次推移

新登録結核患者数と肺非結核性抗酸菌症の罹患率年次推移

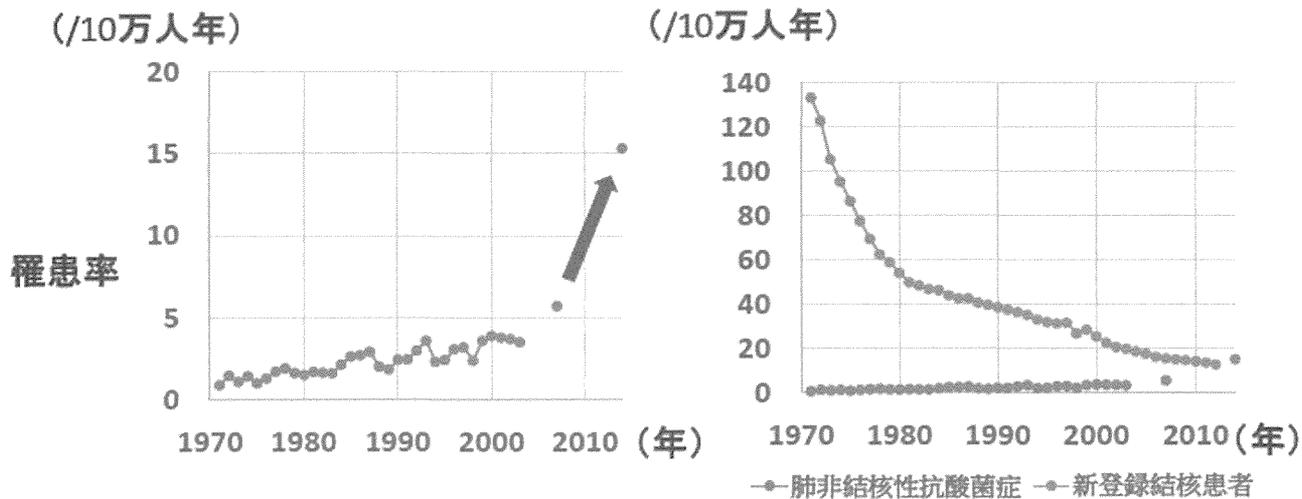


図4 肺結核と非結核性抗酸菌症の罹患率

非結核性抗酸菌症の診断法開発と非結核性抗酸菌の病原性解析

担当責任者 松本壮吉（新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学分野・教授）

研究協力者 Shymaa Enany、西山晃史、尾関百合子（同上）
研究協力者 山本 格、吉田 豊（同上 腎研究施設 構造病理学）
研究協力者 岡真優子（京都府立大学生命環境学部）
研究協力者 西内由紀子（大阪市立大医学医学部 刀根山結核研究所）
研究協力者 前倉亮治、北田清吾（国立病院機構 刀根山病院）

研究要旨：

非結核性抗酸菌症の制御にむけて本研究班は、①非結核性抗酸菌症の診断法開発および、②非結核性抗酸菌の病原性解析を実施する。①については、プロテオミクスーゲノミクスをベースに、感染診断にむけて宿主応答と尿中バイオマーカーの探索を行う。本年度は、プロテオミクス解析にむけた *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* からの抗原性蛋白質の抽出と質量分析による同定系の確立、倫理申請書の受理、尿・血清サンプルの採取と保存（刀根山病院）とパイロット試験を行い、非結核性抗酸菌症患者血清が反応する蛋白質の存在を確認した。②については、NTM の潜在感染にも関わると推定される抗酸菌のヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が発現制御に関与する遺伝子について、プロテオミクス解析系の立ち上げる目的も含め、二次元電気泳動と質量分析により解析した。その結果、定常期の *Mycobacterium smegmatis* において、MDP1 の有無により発現量の異なる蛋白質が 70 スポット以上認められ、3 倍以上の差異の認められた 24 スポットについてゲル抽出-トリプシン消化後、質量分析とデータベース解析で同定した。その結果、23 スポットについて蛋白質を同定した。また、主要な NTM 症の原因菌である *M. avium* subsp. *Hominissuis* のバイオフィーム形成について解析し、低栄養よりも富栄養下、低酸素下においてバイオフィーム形成を行うことを明らかにした。

A. 研究目的

非結核菌抗酸菌症は、近年増加傾向にあり、また難治性であることから、社会的に問題が表面化している。結核やハンセン病と異なり、病原体である非結核性抗酸菌の多くは土壌、水系などの環境中に広く存在し、人によっては常時暴露される機会があることから、患者の患部における菌の証明だけでは、疾患を判定することが難しく、複数回の菌分離が鑑別診断に必要である。このような人環境中に存在する病原体が原因である疾患に対しては、病原体に特異的な宿主の獲得免疫応答が有力な診断情報となる。刀根山病院の前倉亮治博士等が開発した、細胞壁糖脂質を抗原とした診断キットは、そのような観点から非常に有益であるが、感度を向上させる必要がある。

また、通常病原体成分が検出されないような体組織液などから、病原体成分を検出することも重要な疾患情報をなりうる。特に尿は、非侵襲的に容易に患者試料として採取できることから、診断材料として望ましく、肺炎球菌感染症などで有益な検体となっている。

一方、結核菌に比べ非結核性抗酸菌については、その生態や病原メカニズムについての知見が乏しく、診断法を始め、疾患の制御法開発において障害となっている。例えば、非結核性抗酸菌症は、治療困難なことから有病率が高く、菌は生体内に長期にわたって持続感染すると考えられているがそのメカニズムは明かでない。我々はこれまで、結核菌の潜伏・持続感染において Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が、菌の増殖や遺伝