

第 68 回総会シンポジウム

結核研究の進歩 — State of Arts (1)

座長 齋 藤 肇 (島根医科大学)

受付 平成 5 年 8 月 16 日

The 68th Annual Meeting Symposium

I. ADVANCES IN THE RESEARCH OF TUBERCULOSIS

— State of Arts 1 —

Chairman : Hajime SAITO *

Symposists :

1. Advances in diagnostic methods for mycobacteria : Chiyoji ABE (Research Institute of Tuberculosis)
2. Progress and application of molecular genetics in the research of *Mycobacterium tuberculosis* : Yasuo MIZUGUCHI (University of Occupational and Environmental Health)
3. The immunology of mycobacterial diseases : Masayuki ANDO (Kumamoto University School of Medicine)
4. Expectation of new antituberculous drugs and targeting therapy for treatment of mycobacterial infections : Haruaki TOMIOKA (Shimane Medical University)

(Received for publication August 16, 1993)

The above mentioned topics in advances in research of tuberculosis were taken up and their present and future views were reported and discussed.

Key words : Tuberculosis, Diagnosis, Immunology, Genetics, Therapy **キーワードズ** : 結核, 診断, 免疫, 遺伝, 治療

シンポジスト

1. 抗酸菌検査法の進歩
阿部千代治 (結核予防会結研)
2. 結核菌研究における遺伝子工学の進歩とその応用
水口 康雄 (産業医大微生物)

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

3. 結核免疫学の進歩

安藤 正幸 (熊本大1内)

4. 新抗結核剤への期待—ターゲティング療法を含めて

富岡 治明 (島根医大微生物・免疫)

最近における結核研究の進歩のトピックスとして上記の4題がとりあげられ、それらの研究の現況と将来の展望について報告、討議された。

1. 抗酸菌検査法の進歩

①BACTEC 460 TB System, Biphasic MB-Check による臨床材料中の結核菌検出法は小川法よりも優っており、特に塗抹陰性標本において顕著である。わが国でも現行法の改変に目を向ける時が来ていると思われる。②最近、PCR による臨床材料よりの結核菌の早期検出・同定が試みられているが、その有用性が証明された。③わが国でも近年抗酸菌の同定に *M. tuberculosis* complex および *M. avium* complex 用 AccuProbe Culture Confirmation Test が普及しつつあるが、それらの特異性、感度ともに100%であったといい、その有用性が追認された。また DDH-Myco-bacteria では臨床分離株の90%が同定可能であったという。④結核の疫学的研究に IS986 を用いた RFLP 分析の有用性がわが国における結核の小流行例について明らかにされた。

2. 結核菌研究における遺伝子工学の進歩とその応用

最近10年間に結核菌の遺伝学は新しい遺伝学的技術の導入によって著しい進歩がみられた。ここでは抗酸菌遺伝学の進歩を、特に遺伝子クローニング、宿主・ベクター系の樹立、染色体 DNA、プラスミド DNA および抗酸菌フェージ DNA の構造解析、薬剤耐性の遺伝子

レベルでの解明、などの問題を中心に解説された。

3. 結核免疫学の進歩

結核の初感染と再感染における感染防御機構、結核免疫の主役を演ずる Tリンパ球のサブセット、特に γ/δ 細胞ならびに細胞障害性 CD4⁺ 細胞の動態と機能ないし役割、マクロファージの活性化と各種サイトカインとの関連性並びに活性化マクロファージの細胞内殺菌における reactive oxygen intermediates および reactive nitrogen intermediates の役割、さらに AIDS と結核の問題についても解説が加えられた。

4. 新抗結核剤への期待—ターゲティング療法を含めて

近年における結核 (MAC 症) 治療の新薬としては Rifamycin 誘導体, New quinolone, New macrolide がある。Rifamycin 誘導体には Rifabutin, Rifapentine などがあり、わが国では KRM-1648 が開発途上にあるが、いずれも主として MAC を対象として検討されているものである。New quinolones には諸種の薬剤が開発されているが、いずれも結核菌, *M. fortuitum* に対して優れた抗菌活性を有する。New macrolide, なかでも Clarithromycin は優れた抗 MAC 活性をもつ。薬剤を liposome, lipid microsphere, microcapsule などに封入・投与することにより、より優れた治療効果を期待されるターゲティング療法については今後の臨床的応用が期待される。

第 68 回総会シンポジウム

I. 結核研究の進歩 — State of Arts (1)

1. 抗酸菌検査法の進歩

阿部 千代治

結核予防会結核研究所

受付 平成5年8月16日

ADVANCES IN DIAGNOSTIC METHODS FOR MYCOBACTERIA

Chiyoji ABE*

(Received for publication August 16, 1993)

Two systems, biphasic MB-Check and radiometric BACTEC, based on liquid media proved to be significantly better than the egg-based solid media for the isolation of mycobacteria from clinical specimens. The difference in the rates of isolation of mycobacteria between two groups of media was more remarkable with smear-negative specimens. The time to the detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with MB-Check was shorter than that with the 3% Ogawa egg method but longer than that with BACTEC.

A total of 135 sputum specimens were examined by the polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotides based on the repetitive sequence (IS986) of *M. tuberculosis* as a primer. The PCR gave an overall positivity rate of 84.2%, as compared with 71.9% by smear and 96.9% by culture in the liquid medium, MB-Check. Although the sensitivity of the PCR appeared to be similar to that of culture with the MB-Check system, the PCR should be very useful for rapid detection of *M. tuberculosis* infections.

DNA probe technology facilitates a rapid and specific identification of microorganisms. The diagnostic specificity and sensitivity of the nonradioactive Accuprobe *M. tuberculosis* complex and Accuprobe *M. avium* complex culture confirmation tests were nearly 100%. The results of the colorimetric microdilution plate hybridization test (DDH-Mycobacteria) for identification of mycobacteria were consistent with those of biochemical identification. About 90% of clinical isolates could be identified by the DDH kit. Both of these methods may contribute to the rapid diagnosis of mycobacterial infections.

Epidemiological studies with techniques which allow differentiation of strains within *M. tuberculosis* groups are important for limiting the dissemination of the disease. We analyzed six groups of small outbreaks of *M. tuberculosis* infections by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Five showed identical fingerprints within each group, but one which was also suspected to have a common source of infection showed different banding patterns, emphasizing that RFLP analysis using IS986 as a probe is useful

*From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

in epidemiological studies of tuberculosis.

Key words : MB-Check, BACTEC, Polymerase chain reaction, DNA probe technology, RFLP analysis

キーワード : MB-チェック, BACTEC, DNA 増幅法, DNA プローブ診断, RFLP 解析

1. 患者材料からの抗酸菌の分離培養

全抗酸菌症のなかに占める非結核性抗酸菌症の割合は年々増えており、これらの菌は比較的アルカリに弱いこと、塗抹陽性・培養陰性結核菌が増加していること、塗抹陰性検体からの菌の分離率の低いこと、欧米諸国では HIV 陽性者（エイズ患者）の抗酸菌症の診断が難しいことなど、抗酸菌の分離培養を含む検出の面でまだ多くの問題が残されている。

この研究で液体培地を基礎としたラジオアイソトープ標識基質を用いた BACTEC 法および液体培地と寒天培地の二相からなる MB チェックと従来からの卵培地

を用いる小川法で患者材料からの抗酸菌の分離率および検出までに要する時間を測定し、それらシステムの間で比較した¹⁾²⁾。245 例の喀痰を処理して 86 (35.1%) 例から抗酸菌が分離された (Table 1)。これらのうち 3% 小川法陽性は 65 (75.6%)、BACTEC 法陽性は 80 (93.0%)、MB チェック法陽性は 81 (94.2%) であり、液体培地を基礎とした 2 システムの分離率が 3% 小川法と比べ有意に高かった ($P < 0.01$)。液体培地には生えずに 3% 小川法のみ陽性は 2 例みられた。86 分離株のうち 49 株は *M. tuberculosis* complex, 31 株は *M. avium* complex であり、これらで総分離株の 93.0% を占めていた。MB チェックと BACTEC システムは

Table 1 Isolation of Mycobacteria from 245 Sputum Specimens with Different Media

Species (no. of isolates)	No. (%) of isolates detected by the following method :			
	3% Ogawa	Ogawa K	MB-Check	BACTEC
<i>M. tuberculosis</i> complex (49)	39 (79.6)	37 (76.5)	47 (95.9)	47 (95.9)
<i>M. avium</i> complex (31)	24 (77.4)	26 (83.9)	28 (90.3)	30 (96.8)
Other mycobacteria (6)	2 (33.3)	3 (50.0)	6 (100)	3 (50.0)
Total (86)	65 (75.6)	66 (76.7)	81 (94.2)	80 (93.0)

75.5

Table 2 Recovery of Mycobacteria from 245 Smear-Positive and Smear-Negative Specimens with Different Media

Isolates (n)	No. (%) of isolates detected by the following method :			
	3% Ogawa	Ogawa K	MB-Check	BACTEC
Smear-positive <i>M. tuberculosis</i> (37)	33 (89.2)	32 (86.5)	37 (100)	36 (97.3)
Smear-negative <i>M. tuberculosis</i> (12)	6 (50.0)	5 (41.7)	10 (83.3)	11 (91.7)
Smear-positive MOTT (18)	17 (94.4)	17 (94.4)	18 (100)	18 (100)
Smear-negative MOTT (19)	9 (47.4)	12 (63.2)	16 (84.2)	15 (78.9)

M. tuberculosis complex 総分離株の95.9%を検出したが、3%小川法ではこれらの79.6%を検出したに過ぎなかった。

MBチェックは、65塗抹陽性材料から分離された37 *M. tuberculosis* 分離株の100%と、180塗抹陰性材料からの12分離株の83.3%を検出した (Table 2)。一方、3%小川法の検出割合は89.2%と50.0%であった。塗抹陽性材料から分離された非結核性抗酸菌 (MOTT) 18株の100%、陰性材料からのMOTT分離株19の84.2%はMBチェック陽性であったが、小川法の陽性率は94.4%と47.4%であった。すなわち塗抹陽性と陰性材料の両者からの抗酸菌の分離率は、液体を基礎とした2システムが従来からの卵を基礎とした培地より勝れており、この差は塗抹陰性例でより顕著であった。

M. tuberculosis complex の検出までに要する平均日数はMBチェックで19.1日、BACTECで13.4日、3%小川法で21.9日であった。培地の汚染は3%小川法で5.3%にみられたが、MBチェック、BACTEC、小川K培地では1%以下であった。

これらの結果は、液体を基礎としたMBチェックとBACTECシステムが臨床材料からの抗酸菌の分離に非常に有効であることを示している。BACTECシステムは培地中に放射性物質を含むため日本で臨床検査に取り入れるのは困難と考えられるが、MBチェックはすでに多くの病院検査室で取り入れられつつある。

2. PCRによる臨床材料中の結核菌の検出

ここ数年、PCRによる抗酸菌属あるいは結核菌の迅速検出の報告がされている。

われわれはその存在が *M. tuberculosis* complex に属する菌に限られている因子、IS986³⁾ の配列に基づいたオリゴヌクレオチドをPCRのためのプライマーとして用いた。臨床分離株の間でIS因子のコピー数は1~19と変化があるが、大部分の株は8と15コピーの間である⁴⁾。これらオリゴヌクレオチドの使用はPCRの感度を上げる上で有効である。ミドルブルック7H9液体培地培養菌を用いた感度試験でPCRは10CFU以下で陽性であった。また、結核菌H37Rvから精製したDNAを用いた試験では、検出限界は1fgであり (Fig. 1)、これは約1個の菌に存在するDNA量に相当する。

23種の臨床的に重要な抗酸菌の標準株を用いた試験で541bp DNAは *M. tuberculosis* complex に属する菌種からのDNAを鋳型としたときのみPCRにより増幅されたが、他菌種からのDNAを用いたときにはPCR産物は認められなかった。

PCR反応におけるDNAコンタミネーションのソースとして、①操作中にサンプル間で起こるコンタミネー

ション、②実験室環境からのプラスミドの混入、③以前に増幅した産物やプライマーの持ち込みなどが考えられるが、その中で③が主要なソースである。dTTPの代わりにdUTPを用いてもPCR産物は得られる。その結果得られたウラシルを含むDNAはPCR反応前にウラシルDNAグリコシラーゼ (UNG) との反応により完全に分解される (Fig. 2)。

このようにdUTPとUNGの使用によりcarry-overコンタミネーションを防ぐことが可能となったが、根本的にはPCR反応液の調製室、臨床材料の処理・



Fig. 1 Endpoint determination of the PCR amplification of purified DNA.

Lane 1, *Hae*III-digested ϕ X174 DNA; Lanes 2 to 5, the products after PCR amplification of 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg and 0.1 fg of purified DNA from *M. tuberculosis* H37Rv.

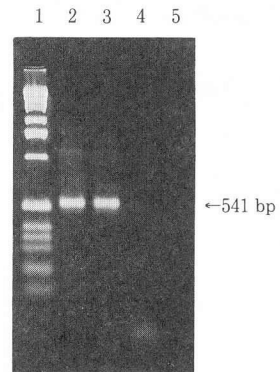


Fig. 2 Agarose gel analysis of PCR-amplified DNA from two subsequent runs, using incorporation of dUTP and incubation with UDG. Ten microliters of amplified *M. tuberculosis* and *M. bovis* DNAs (lanes 2 and 3) from the first PCR runs were treated with dUTP and UDG, and used for the second PCR runs for reamplification (lanes 4 and 5).

DNA 抽出室, DNA 増幅・検出室の3室を独立した部屋にすることが必須である。また使用する水, 容器なども DNA フリーのものを選ばねばならない。

135 喀痰材料が試験された。32 は塗抹陽性であり, 50 は培養陽性であった。分離抗酸菌のうち 32 は *M. tuberculosis* complex として, 16 は *M. avium* complex と同定された。MB チェックで 31 例から *M. tuberculosis* を検出できたが, 小川法陽性は 24 例にすぎなかった。培養陽性 32 例の中で 26 例は PCR 陽性であったが 6 例は陰性であった (Table 3)。一方培養陰性例の中で, 塗抹陰性 5 例と塗抹陽性 1 例の計 6 例が PCR 陽性であった。これらの例はいずれも結核の臨床所見を示していた。非結核性抗酸菌の検出された 18 例の材料からは, PCR 産物は得られなかった。結核菌の検出のための PCR の全体の感度は 84.2% (32/38), 塗抹試験のそれは 71.9% (23/32) であった。このように, 臨床材料からの結核菌の検出のための PCR の感度は, 卵培地を用いた培養法よりは勝れていたが, 液体を基礎とした培地を越えるものではなかった⁵⁾。しかし PCR 法は臨床材料から結核菌を直接しかも迅速に検出できることから, 迅速な診断が要求される例において, 特に HIV 感染者などの診断に有効であろう。

3. 核酸の相同性を利用した菌種の鑑別同定

非結核性抗酸菌症の中に占める *M. avium* complex (MAC) 症の割合は約 70% であり年々増加傾向にある。MAC に属する菌は多くの抗結核薬に耐性を示すことから MAC 症においては結核症や *M. kansasii* 症とは異なる治療法が取られている。それ故, 結核菌および MAC の迅速鑑別は重要である。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁶⁾ によれば, 細菌の分類は全染色体 DNA の相同性に基礎を置く事とされており, 1 つの種は 60% 以上の DNA 相同性を持つ菌株を含むべきとする考えが示されている。これらの定義に従えば, 定量的ハイブリダイゼーションにより菌種の鑑別同定が可能となる。プローブとして全染色体 DNA を用いるハイブリダイゼーション法と特異性の高いプローブを用いる方法がある。*M. tuberculosis* と *M. avium* complex の間の鑑別に全染色体 DNA を用いたハイブリダイゼーション法が利用できることを Roberts ら⁷⁾ は報告した。さらに Imaeda ら⁸⁾ は, 一部の抗酸菌の間の鑑別を除いて大部分の菌種の同定は全染色体 DNA でできることを示した。一方, 標的として染色体 DNA の代わりにリボソーム RNA (rRNA) を用いる方法がある。1 個の菌体に存在する rRNA の分子数は染色体 DNA の上にある遺伝子のコピー数の 100 倍以上である。それ故, 標的として rRNA を用いる RNA : DNA ハイブリダイゼーション法が, 標的として DNA を用いる DNA : DNA ハイブリダイゼーション法より高い反応が期待でき, 材料中に含まれる菌量が少ない場合にはより有効である。

Gen-Probe 社で開発された *M. tuberculosis* complex および *M. avium* complex 迅速鑑別キットはリボソーム RNA の菌種特異領域, 約 40 ベースに相補的 DNA をプローブとしたキットである。これまでのキットは ¹²⁵I 標識プローブを用いていたため, その使用は放射性物質の使用が可能な検査室に限られていた。その検出も放射性物質標識からアクリジニウムエステル標識 (化学発光システム) に代わり, バイオハザード対策の面で改善された。*M. tuberculosis* complex 鑑別同定

Table 3 Comparison of Polymerase Chain Reaction with Conventional Smear and Culture Examinations in Sensitivity of Detection of *M. tuberculosis* in Clinical Specimens

Specimens	PCR	
	Positive	Negative
Smear-positive/culture-positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	21 ^{a)}	1
Smear-negative/culture-positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	5	5
MOTT ^{b)} positive in culture	0	18
Smear-positive/culture-negative	1	2
Smear-negative/culture-negative	5	77
Total	32	103

a) Number of specimens

b) Mycobacteria other than tubercle bacilli

Table 4 Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolated from Culture Using the Accuprobe *M. tuberculosis* Complex Culture Confirmation Test

Isolates (n)	Relative Light Units [Mean±SE (range)]
<i>M. tuberculosis</i> (30)	376,156±4,687 (329,179-441,585)
<i>M. africanum</i> (2)	407,292±48,982 (358,311-456,273)
<i>M. microti</i> (1)	401,709
<i>M. avium</i> complex (15)	1,806±245 (1,116-4,726)
<i>M. kansasii</i> (3)	2,118±178 (1,941-2,296)
<i>M. xenopi</i> (1)	1,561
<i>M. nonchromogenicum</i> (1)	2,376
<i>M. fortuitum</i> (1)	1,713
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> (1)	1,914

用アキュプローブキットの特異性と感度は両者とも100%であった⁹⁾(Table 4)。また *M. avium* complex キットのそれらは100%と99%であった。操作は簡便でその判定も容易であり、約2時間で同定結果が得られる。しかしアッセイにはまだ最低 10^6 個の菌が必要であり、このキットの使用は培養菌に限られる。他方、抗酸菌の検出の項でも記述したように、液体培地は抗酸菌の増殖と検出において卵培地より勝れていることから、このキットとの組み合わせによる迅速診断も可能である。

Kusunoki ら¹⁰⁾は、標準株の全染色体DNAをマイクロプレート上にあらかじめコートしておき、それとフォトビオチン標識検体DNAの間のハイブリダイゼーションにより抗酸菌菌種を同定するマイクロプレート法を開発した。抗酸菌標準菌株間の相対類似度をTable 5に示した。このキットの使用により抗酸菌18菌種の同定が可能であり、4~6時間以内にすべての工程が終了、同定結果が得られる。マニュアルに従い測定した時臨床材料から分離される菌株の80%以上は、この方法で同定が可能である。しかし少数の菌種では、従来からの培養法・生化学的方法で同一の菌種として鑑別同定された菌株のなかに、DNAで別の菌種として同定される菌株が見ついている。菌種内にサブタイプがあるのか、あるいは菌種内で相対類似度が連続的に変化しているのかはまだ明らかではなく、今後の検討が必要である。キットの操作にあたり、抗酸菌の菌種によりDNAの比較的精製しやすいものとそうでないものがある。完全な溶菌、DNAの抽出のためには適正な量の菌を使うことが重要である。また特異性を保持するためにはハイブリダイゼーション温度と時間を厳守せねばならない。

4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析

感染個体から分離した菌株の型別は、感染源を追跡す

る上で重要である。この種の目的のため、これまでフェージ型別と薬剤感受性パターンの比較が用いられてきたが、詳細な分析には用をなさなかった。

染色体DNAの上には種々の情報をコードしている遺伝子があり、通常はそれぞれの遺伝子は1~2コピー存在する。しかしその中に2個以上存在する挿入配列(IS)も見つかった。抗酸菌でもいくつか報告されている。これらのISはDNA再配列の際に転位すると考えられており、世代を重ねる間に増減が見られ、染色体上の挿入部位にも変化が生じる。このように複数コピー存在し、転位部位にも変化が見られることから、制限酵素で切断後アガロース電気泳動で分離して調べるRFLP解析により、結核菌群に属する菌の型別(亜分類)が可能となる。

IS986をプローブとした解析から、次のようなことが明らかにされた。アフリカなど結核蔓延地域で分離された結核菌の間ではそのRFLPパターンに類似性がみられるが結核の罹患率が低く、結核症の大部分は以前に感染を受けた菌による再燃と考えられているオランダで分離された菌は多形性に富んでいる¹¹⁾。わが国で分離された菌株については地域間に多形性がみられるが、Fig. 3に示したように同一地域内ではパターンが類似していた⁴⁾。この結果は、日本ではオランダと比べ罹患率が相対的に高いことを暗に裏づけているものと思われる。転位の頻度はまだ明らかではないが、それほど高いものではない。

疫学的調査から、集団感染や小規模感染の疑われた件で、多くはそれぞれの間で全く同一のパターンを示し、共通の感染源の特定には有効である(Fig. 4)。*M. bovis* BCG サブストレイン間で日本株、ロシア株、ブラジル株はバンドが2本でそれらは共通である(Fig. 5)が、バスツール株、グラクソ株など他の株は2本のうち1本のみが検出される⁴⁾。この違いが生物活性やタンパ

Table 5 Identification of 18 Reference Strains of Mycobacteria by Microdilution Plate Hybridization Method

Immobilized organism	Relative relatedness (%) with the following organism :																		
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae subsp. chelonae</i>	<i>M. chelonae subsp. abscessus</i>	" <i>M. peregrinum</i> "
2. <i>M. bovis</i>	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>M. kansasii</i>	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	54	-	-	-	-	32	-	36	-
4. <i>M. marinum</i>	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. <i>M. simiae</i>	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. <i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. <i>M. gordonae</i>	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8. <i>M. szulgai</i>	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. <i>M. avium</i>	-	-	-	-	31	49	-	-	100	53	-	-	-	-	-	-	31	41	-
10. <i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	38	-	-	44	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. <i>M. gastri</i>	-	-	61	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
12. <i>M. xenopi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
13. <i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	42	-	-	-	-	-
14. <i>M. terrae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-
15. <i>M. triviale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-
16. <i>M. fortuitum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	49
17. <i>M. chelonae subsp. chelonae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
18. <i>M. chelonae subsp. abscessus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
19. " <i>M. peregrinum</i> "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49	-	-	100

- : less than 30 %

(Kusunoki et al., 1991. J. Clin. Microbiol.)

クの産生性に関わるかどうかはまだ明らかでない。これらと共通のバンドは *M. tuberculosis* にみられないことから、*M. bovis* (BCG) と *M. tuberculosis* との鑑別に有効である。

5. その他の検査法

ミコール酸の HPLC パターン¹²⁾ や全菌体脂肪酸のガスクロパターンのコンピューター解析や α 抗原分析、菌種特異的タンパクおよびモノクローナル抗体などによる菌種の同定、あるいは矢野らによる血清中の抗 TDM 抗体価の測定による抗酸菌症の診断¹³⁾ など新しい検査法の開発も進められてきている。

文 献

- 1) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. : Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 878-881.
- 2) 阿部千代治, 細島澄子 : 液体培地による抗酸菌の迅速診断, 結核. 1990 ; 67 : 781-786.
- 3) Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 2567-2575.

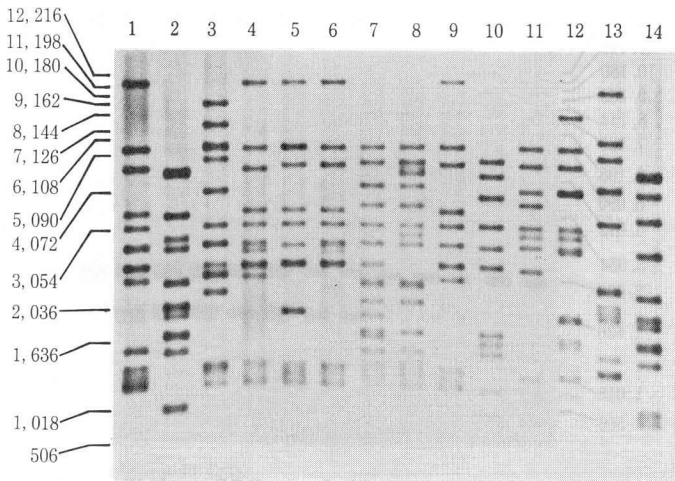


Fig. 3 DNA fingerprints of *M. tuberculosis* isolated in the Kanto district. Lanes 1, 2 and 3, isolated at A hospital ; lanes 4, 5 and 6, at B hospital ; lanes 7 and 8, at C hospital ; lanes 9, 10, 11, 12 and 13, at D hospital ; lane 14, at E hospital, respectively.

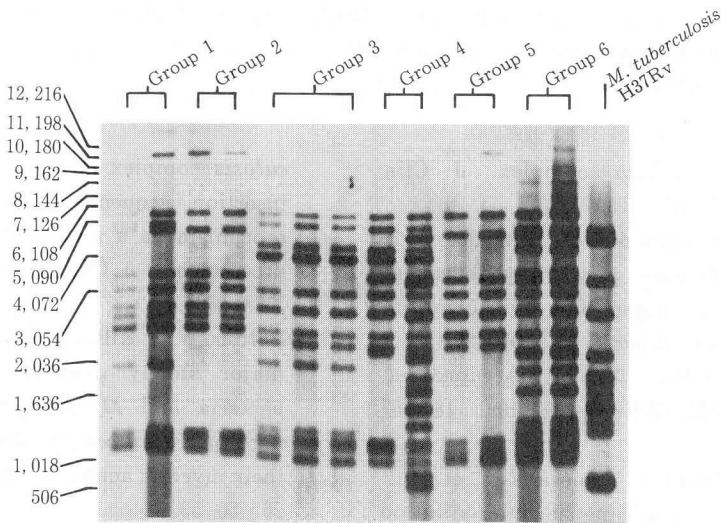


Fig. 4 RFLP analysis of epidemiologically related *M. tuberculosis* from tuberculosis patient. Groups 1, 4 and 5, the small outbreak in the office ; groups 2 and 3, the small outbreak in the school ; group 6, familial infection, respectively.

4) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol.* 1993 ; 37 : 289-294.

5) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterim Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol.* 1993 (in press).

6) Jonson JL : Nucleic acids in bacterial classification. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 1987 ; Vol 2, pp. 972-975.

7) Roberts MC, McMillan C, Coyle MB : Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and

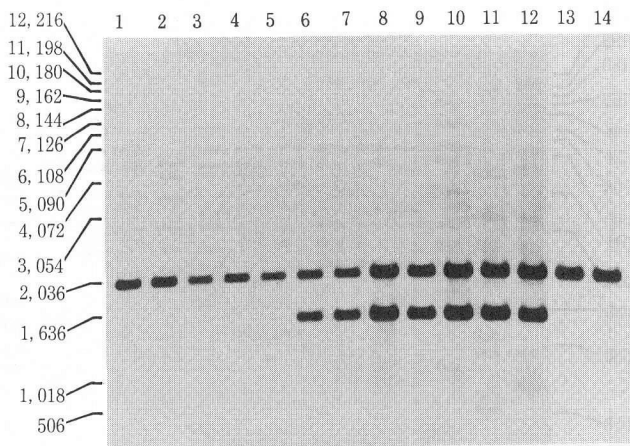


Fig. 5 DNA fingerprint of various *M. bovis* BCG and *M. bovis* strains and RFLP analysis of clinical isolates of *M. bovis* BCG. Lane 1, BCG-Pasteur ; lane 2, BCG-Glaxo ; lane 3, BCG-Sweden ; lane 4, BCG-Copenhagen ; lane 5, BCG-Tice ; lane 6, BCG-Moreau ; lane 7, BCG-Russian, lane 8, BCG-Tokyo ; lane 9, isolate from a bladder cancer patient with BCG instillation therapy ; lanes 10, 11 and 12, isolates from individuals with lymphadenitis developed after BCG vaccination ; lane 13, *M. bovis* Ravenel ; lane 14, *M. bovis* Neotype JATA 1201, respectively.

Mycobacterium avium complex. J Clin Microbiol. 1987 ; 25 : 1239-1243.

- 8) Imaeda T, Broslawski G, Imaeda S : Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1988 ; 38 : 151-156.
- 9) 阿部千代治, 鹿住祐子, 深澤 豊 : Accuprobe による抗酸菌の同定, 臨床と微生物. 1991 ; 18 : 557-561.
- 10) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al. : Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 1596-1603.
- 11) Van Soolingen D, Hermans PWM, De Haas PEW, et al. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuber-*

culosis complex strains : Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 2578-2586.

- 12) Bultler WR, Kilburn JO : Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol. 1988 ; 26 : 50-53.
- 13) Hua H, Oka S, Yamamura Y, et al. : Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. FEMS Microbiol Lett. 1991 ; 76 : 201-204.

第 68 回総会シンポジウム

I. 結核研究の進歩 — State of Arts (1)

2. 結核菌研究における遺伝子工学の進歩とその応用

水 口 康 雄

産業医科大学・微生物学教室

受付 平成 5 年 8 月 16 日

PROGRESS AND APPLICATION OF MOLECULAR GENETICS IN THE
RESEARCH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Yasuo MIZUGUCHI *

(Received for publication August 16, 1993)

In the last decade, a great deal of advances in the genetics of *Mycobacterium tuberculosis* have been made by the introduction of new genetic technologies. In this review, a brief discussion of the progress in mycobacterial genetics, especially, gene cloning, development of host-vector systems, structural analysis of chromosomal DNA, plasmid DNA and mycobacteriophage DNA, IS element, and drug resistance mechanism was presented.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular genetics, Gene cloning, Host-vector system, IS elements, Sequence analysis, Drug resistance mechanism

キーワードズ : 結核菌, 分子遺伝学, 遺伝子クローニング, 宿主・ベクター系, 挿入因子, 塩基配列, 薬剤耐性機構

はじめに

結核菌は増殖に長時間を必要とする, 厚い細胞壁のため DNA の抽出が困難である, など遺伝学の材料としてはあまり好適でないこともあり, 遺伝子工学の手法が多く微生物に適用されるようになった後も, しばらくの間はその遺伝学的研究はほとんど手つかずの状態が残されてきた。しかし感染症としての結核の重要性を再認識する動きにも支えられ, 結核菌を中心とする抗酸菌の研究が盛んになるにつれ, 新しい技術を駆使した遺伝学的な仕事が多数の研究者によって行われるようになってきており, 近年の進歩には目覚ましいものがある。

その研究内容は多岐にわたるが, 本シンポジウムにおいては, 他の演者と重複する可能性のある部分を除いて結核菌に関する遺伝学的な研究の現状について紹介し, 併せて将来に期待される研究の成果についての予測も試みてみたい。

(なお, 紙面の制約上, 引用文献の数を代表的なものだけに限らせて頂いたことを御容赦頂きたい)。

1. クローン化された結核菌の遺伝子

結核菌をはじめとする抗酸菌の遺伝子は, 特にその上流のプロモーターとよばれる部分の構造の違いから, 大腸菌の中では情報発現を行わないことのほうが多い。し

* From the Department of Microbiology, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishiku, Kitakyushu 807 Japan.

たがって大腸菌等の宿主・ベクター系を用い、結核菌からある特定の遺伝子をクローン化するには、それなりの工夫が必要となる。これまで、以下に述べるような4つの方法が主として用いられてきている(ただし、これらの方法を用いても結核菌のすべての遺伝子をクローン化することは困難である)。

その第1は、 λ gt11 フェージのような発現ベクターを用いることにより強制的に情報発現を行わせておき、特定の蛋白に対する抗体を用い、その抗体と反応するクローンの検出を行うものである¹⁾。第2の方法は特定の機能を欠損させた大腸菌の変異株を宿主菌として用い、この菌に結核菌のDNAを導入してその欠損した機能を補うクローンを選び出すことにより遺伝子を分離するものである²⁾。結核菌のプロモーターが大腸菌で機能する場合には、この方法を用いることができる。第3の方法は蛋白の構造から推定されるオリゴヌクレオチドプローブを作製し、これを用いてハイブリダイゼーションにより遺伝子を釣り上げるものである³⁾。第4はクローン化された他菌種の遺伝子をプローブとして用い、3と同様に遺伝子を分離する方法である⁴⁾。

これらのいずれかの方法を用いてこれまでに多くの結核菌の遺伝子がクローン化され、そのうちの20をこす遺伝子については塩基配列が明らかにされてきた(表1, 表2)。それらには、一連の熱ショック蛋白(70 kD, 65 kD, 12 kD)や α 抗原を含む antigen 85 complex等の分泌蛋白, 各種の酵素蛋白(*recA*, SOD, alcohol dehydrogenase等)の遺伝子などが含まれている。これらの蛋白の中には結核の免疫に重要な役割を演じている可能性のあるものも含まれているが、その点についての説明は今回は省略したい。

これらのクローン化の研究の中で特に重要と思われるものを1つ挙げておくと、Zhangらによるカタラーゼ遺伝子に関する仕事が挙げられる⁵⁾。彼らは結核菌からカタラーゼ遺伝子をクローン化し、イソニアジド耐性となった結核菌にこのカタラーゼ遺伝子をベクター系を使って導入したところ、イソニアジド感受性が元に戻ることに、この遺伝子を導入された大腸菌もイソニアジド感受性が高まることを見いだした。さらに高度耐性になった結核菌はこのカタラーゼ遺伝子を欠損していることも併せて報告している。

イソニアジド耐性がカタラーゼ活性の減弱または消失と関係していることは古くから知られているところであるが、彼らの研究によりイソニアジド感受性とカタラーゼ活性が直接関係していることが遺伝子レベルで明確に示されたことになる。恐らくイソニアジドはそのままでは抗菌力がなくイソニアジドの peroxidation が活性型を誘導するものと思われるが、この活性化されたイソニアジドがその作用機序といわれるミコール酸の合成阻

表1 クローン化された結核菌蛋白遺伝子(その1)

熱ショック蛋白	
71 kD	Dnak 類似
65 kD	GroEL 類似
14 kD	α -crystallin 様
12 kD	GroES 類似 MPB57
リボ蛋白	
38 kD	磷酸代謝に関連
19 kD	
分泌蛋白	
32 kD	α 抗原 85A MPT44 85B MPT59 85C MPT45
23 kD	MPB64
16 kD	MPB70
その他	
35 kD	
14 kD	結核菌特異的
<i>M. intracellulare</i> 19 kD, 18 kD, 27 kD	
<i>M. avium</i> 22 kD (avi 3), 31 kD, 19 kD	
<i>M. kansasii</i> 32 kD (α 抗原)	

害とどのように結び付くのが今後に残された問題であろう。

2. 抗酸菌を宿主とする宿主・ベクター系の開発

大腸菌の宿主・ベクター系のみで抗酸菌の遺伝的な解析を行うのには限界があり、どうしても抗酸菌そのものを用いた宿主・ベクター系が必要であることに加え、BloomによりBCGを用いた多用途ワクチンのアイデアが発表されたことで⁶⁾、この方面の研究は急速な発展を遂げるようになった。1988年、Snapperらは*Mycobacterium fortuitum*由来のプラスミドpAL5000と大腸菌のプラスミドから作製した組換えプラスミドを電気穿孔法をもちいてBCGに導入したところ、安定に複製が行われ、しかも大腸菌に由来するカナマイシン耐性の遺伝子が抗酸菌でも発現することを見だし、この研究に道をつけることになった⁷⁾。その後、われわれも含めたいくつかのグループからも抗酸菌で複製可能な組換えプラスミドについての報告が行われている^{8,9)}。

抗酸菌の宿主・ベクター系が得られた事により、結核菌の病原性や、感染防御免疫を支配する遺伝子の解析が可能になってきたが、さらにBCGを宿主とする多用途ワクチンの開発も可能になってきた。特に後者に関しては、いくつかのグループがヒト免疫不全ウイルス遺伝子⁹⁾、マラリア原虫の抗原遺伝子¹⁰⁾、破傷風毒素遺伝子¹¹⁾等をBCGに導入し、情報発現を行わせている。

表2 クローン化された結核菌の遺伝子(その2)

酵素(蛋白)等名	分子量	機能	クローン化の方法
catalase-peroxidase	84kD	INH感受性(病原性)	A
superoxide dismutase	23kD	病原性?	C
alcohol-dehydrogenase	37kD	細胞壁WAX合成	C
L-alanine dehydrogenase	39kD	細胞壁合成等	C
5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase	53kD	芳香族アミノ酸合成 (AroA)	B
3-dehydroquinate synthase	38kD	(AroB)	B
3-hydroquinase	17kD	(AroQ)	B
ornithin carbamoyl transferase	38kD	アルギニン合成	B
diaminopimelic acid decarboxylase	47kD	リジン合成(lysA)	B
mycoserosic acid synthase	225kD	細胞壁脂質合成	A
RecA	38kD	遺伝的組換えなど	A
RNA polymerase B		Rifampicin 耐性	D
elongation factor Tu	44kD	蛋白合成	C
ribosome RNA		リボソーム	
diaminopimelic acid 合成酵素群 DapA, B, D, E など (<i>M. tuberculosis</i>)			
catalase-peroxidase, リボソーム S-12 蛋白 (<i>M. intracellulare</i>)			
細胞壁グリコペプチド合成遺伝子群 (<i>M. avium</i>)			
citrate synthase, acetamidase, histidine 合成酵素遺伝子 (<i>M. smegmatis</i>)			
カロチノイド色素合成酵素遺伝子群 (<i>M. aurum</i>)			

A: オリゴヌクレオチドプローブ B: 大腸菌の complementation
 C: モノクローナル抗体 D: 遺伝子(他菌種)プローブ
 欄外は結核菌以外、もしくはクローン化されただけで構造の解析が行われていないもの。

情報発現を起こさせるためには、単に遺伝子を導入しただけでは不十分であり、これらの遺伝子の上流部分に抗酸菌の遺伝子のプロモーターを連結する必要がある。いずれにせよ、将来これらの系を用いた多価ワクチンが実際に使われるようになることが期待される。

また結核菌や非定型抗酸菌の遺伝子を *M. smegmatis* や *M. tuberculosis* に導入してその発現を行わせた報告も認められるようになった。前述のイソニアジド耐性の機序についての研究はその代表的なものといえよう。

3. 抗酸菌の染色体の構造の解析

パルスフィールド電気泳動法が開発されたことにより数百キロベース(kb)を越すような巨大DNA分子を電気泳動により分離同定することが可能になり、多数の病原菌で染色体の構造を明らかにする研究が行われるようになった。ただしこの方法を抗酸菌に応用するためには、寒天のブロック内で全く外力を加えずに菌を効率よく溶解し、無傷の染色体DNAを取り出す方法を開発することが必要となる。抗酸菌をグリシンの存在下で培

養し、リゾチームやその他の溶菌酵素、プロテイナーゼk, SDS等を用いて処理するといった方法等を用いることにより、その目的が達成されるようになってきた。

このようにして抽出された染色体DNAを適当な制限酵素で処理した後、電気泳動にかけることにより、菌の染色体がどのような断片から構成されているか、そのサイズはどの程度であるか、それらの断片の相互間の位置関係、またそれらの断片の上にもどのような遺伝子が存在しているか、などの解析が可能となる。

実際に染色体DNA断片の数と個々の断片のサイズを測定することにより、各種の抗酸菌のゲノムサイズが明らかになってきた。それによると *M. tuberculosis* では3.0~4.2メガベース(Mb)¹²⁾, *M. fortuitum* では4.2~5.0 Mb, *M. smegmatis* では6.0~7.0 Mb という数字が得られている。またハイブリダイゼーションにより、いくつかの遺伝子(α 抗原遺伝子など)がどの断片に存在するかも知られるようになってきた。

また、DNA断片の電気泳動パターンの違いから、同一菌種における菌株間の型別も考えられ、実際に *M.*

*tuberculosis*¹³⁾ や *M. fortuitum* でその可能性が示された。われわれは *M. smegmatis* を用い、2つの異なる菌株とその間から得られた接合による組換え体について調べたところ、親株どうしのパターンに差が見られること、組換え体は片方の親株のいくつかの断片がもう一方の親株からの遺伝子断片によって置き換えられていること、その断片の長さの合計は数百 kb に及ぶことなどを見いだしている。

このような染色体の構造解析の研究に加え、ここでは、もう1つ IS element について説明を加えておく必要がある。IS element とは一定の構造を持った転移可能な DNA 断片のことをいい、染色体やプラスミドのいろいろな所に組み込まれ、突然変異を起こすなどの機能を持つことが知られているが、これまでの研究により種々異なる抗酸菌種にこの IS element が存在することが見いだされている¹⁴⁾。

それらを表3に示したが、この IS element は菌株により組み込まれている場所やそのコピー数が異なるため、その位置やコピー数を知ることにより菌の型別に使うことが出来る¹⁵⁾。そのほか特定の遺伝子に変異を起こさせたり、染色体への組み込みのベクターにも用いることも可能であり、今後の抗酸菌の遺伝解析に重要な役割を演じることが期待される。

4. 抗酸菌のファージおよびプラスミドの遺伝学

ファージやプラスミドは、菌の染色体よりずっと小さ

い遺伝の単位である。したがって、その解析は菌の染色体の解析よりはるかに容易である。事実これまでに抗酸菌のプラスミドのうち、宿主・ベクター系にしばしば用いられる *M. fortuitum* 由来のプラスミド pAL5000 についてはその全ヌクレオチド配列が解析され、またその中のどの部分が複製に必要であるかも報告されている¹⁶⁾。

われわれは、やはりベクター系に用いた *M. scrofulaceum* 由来のプラスミド pMSC262 からその複製に必要な最小の領域を決定し、その構造を明らかにしてきた。その結果、複製に必要な領域は約 1.5 kb の範囲に含まれること、その領域の中には恐らくプラスミドの複製に必要な DNA 結合蛋白をコードする遺伝子に加え、複製開始領域と考えられる繰り返り構造に富む部分があることを明らかにした。これらの結果は抗酸菌における DNA の複製の機構を明らかにする上で重要である。

一方、Hatfull らは道家により分離された L5 ファージの全ヌクレオチド配列 (52,297 塩基対よりなる) を明らかにした¹⁷⁾。大腸菌のファージ以外で全ヌクレオチド配列が明らかにされたのはこれが初めてであるが、それによると、GC 含量は 63.2%，88 個の遺伝子が存在しており、その遺伝子の構成や配列は λ ファージと類似した所があると報告されている。その遺伝子のいくつかについては機能も明らかになっており、この解析の結果から多くの情報が得られることになった。将来、ここで得られた情報を基に、大腸菌における λ ファージのよう

表3 抗酸菌にみられる IS Element

名称	菌種	サイズ (bp)	コピー数
IS6110	<i>M. tuberculosis</i> complex	1361	6~17 (結核菌)
IS986 (IS987)		1386	1~5 (牛型菌)
IS1081	<i>M. tuberculosis</i>	1324	5~6
IS900	<i>M. paratuberculosis</i>	1451	15~20
IS901 (IS902)	<i>M. avium</i>	1472	5~12
IS1096	<i>M. smegmatis</i>	2275	8~16
IS6120	<i>M. smegmatis</i>	1486	2~8
Tn610 (IS6100)	<i>M. fortuitum</i>	3970	1 (sulfa 剤耐性)

IS6110 および IS986 は IS3 family と呼ばれヌクレオチド配列はほとんど同じ。

IS900 と IS901 は 60% 程度にホモロジーを示す。

Tn610 のサイズが大きいのは sulfa 剤耐性遺伝子を含むため。

に抗酸菌の遺伝子操作のベクターとしてこのL5ファージが利用できる可能性が大きいと思われる。

5. 結核菌の遺伝学の将来

これまでに述べてきたように、結核菌を中心とする抗酸菌の分子遺伝学的研究は急速に発展しつつある。そこで今後予測される、あるいは期待される研究の方向について考えてみたい。

その1は、結核菌の病原性を支配する遺伝子の分子レベルでの解明である。もとより単一の遺伝子によって支配されているとは考えにくい、例えば弱毒になった結核菌の強毒菌との比較、あるいは強毒菌からの遺伝子の導入による毒力の復帰といった方法などにより、その解析は可能であると考えられる。

第2は、薬剤耐性機構の分子レベルでの解明で、すでにイソニアジド耐性については説明したが、最近リファンピシン耐性についてもその機構が明らかにされてきている¹⁸⁾。今後さらに種々の化学療法剤に対する耐性の機構の解明が期待される。

第3は感染防御を担う抗原の遺伝子レベルでの解析である。これが明らかにされれば、より有効なワクチンの開発が可能になると思われる。また他の微生物由来の遺伝子を組み込んだ多用途ワクチンの開発もそう遠くない将来に実用化される可能性が高い。

第4は、より特異性の高い抗原や遺伝子プローブを用いた結核症診断への応用であり、既にハイブリダイゼーション法やPCRなどによる検討が行われているが、今後一層の進歩が期待される。

む す び

遺伝子工学の手法が抗酸菌へ応用されるようになって、これまでの細菌学では解析不能であったことが次々と明らかにされるようになってきた。全く新しい世界をわれわれに切り開いてくれたことになる。今後のますますの発展が期待される。

文 献

- 1) Young RA, Bloom BR, Grosskinsky CM, et al. : Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 ; 82 : 2583-2587.
- 2) Nair S and Steyn LM : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA* homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol. 1991 ; 137 : 2409-2414.
- 3) Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, et al. : Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infec Immun. 1989 ; 57 : 283-288.
- 4) Bercovier H, Kafri O, Kornitzer D, et al. : Cloning and restriction analysis of ribosomal RNA genes from *Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiol Lett. 1989 ; 57 : 125-128.
- 5) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 1992 ; 358 : 591-593.
- 6) Bloom BR : Learning from leprosy : A perspective on immunology and the third world. J Immunol 1986 ; 137 : i-x.
- 7) Snapper SB, Lugosi L, Jekkel A, et al. : Lysogeny and transformation in mycobacteria : Stable expression of foreign genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1988 ; 85 : 6987-6991.
- 8) Goto Y, Taniguchi H, Udou T, et al. : Development of a new host vector system in mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1991 ; 83 : 277-282.
- 9) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, et al. : Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. Infec Immun. 1990 ; 58 : 4049-4054.
- 10) Haeseleer F, Pollet J-F, Haumont M, et al. : Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. Mol Bioch Parasitol. 1993 ; 57 : 117-126.
- 11) Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst JE, et al. : New use of BCG for recombinant vaccines. Nature. 1991 ; 351 : 456-460.
- 12) Young DB, and Cole ST. : Leprosy, Tuberculosis and the new genetics. J Bacteriol. 1993 ; 175 : 1-6.
- 13) Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, et al. : DNA polymorphism in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis : A tool for epidemiology. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 1551-1556.
- 14) Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al. : IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acid Res.

- 1990 ; 18 : 188.
- 15) van Embden JA, Cave MD, Crawford JT, et al. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : Recommendation for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 406-409.
- 16) Labidi A, Mardia E, Roe BA, et al. : Cloning and DNA sequence of the *Mycobacterium fortuitum* var *fortuitum* plasmid pAL5000. Plasmid. 1992 ; 27 : 130-140.
- 17) Hatfull G, and Sakris GJ. : DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5 : A phage system for mycobacterial genetics. Molec Microbiol. 1993 ; 7 : 395-405.
- 18) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993 ; 341 : 647-650.

第 68 回総会シンポジウム

I. 結核研究の進歩 — State of Arts (1)

3. 結核免疫学の進歩

安藤正幸

熊本大学医学部第1内科

受付 平成5年8月16日

THE IMMUNOLOGY OF MYCOBACTERIAL DISEASES

Masayuki Ando, M. D.*

(Received for publication August 16, 1993)

Protection and pathogenesis of tuberculosis greatly depend on specific T lymphocytes. Recent evidence suggests the existence of at least two pathways of acquired specific resistance to *M. tuberculosis* infection: The first consists of cytokine-mediated activation of infected host cells by protective CD4⁺ T cells, which are currently believed to mediate antimicrobial activity via the release of macrophage activating cytokines such as IFN- γ and TNF- α . The second involves the lysis of these infected cells by cytotoxic effector CD4⁺ T cells, which is class II MHC restricted, requires cell-to-cell contact mediated by the ICAM-1 and LFA-1 ligand pair, and appears to be independent of lymphotoxins and through the direct cell interaction by adhesion molecules such as LFA-1 and ICAM-1 but not cytokines.

On the other hands, $\gamma\delta$ T cells might be part of the primary response to infection with live *M. tuberculosis*. $\gamma\delta$ T cells have the potential to express cytotoxicity for mononuclear phagocytes pulsed with mycobacterial antigens, and are capable of secreting a variety of cytokines, including IL-2 and IFN- γ .

Intracellular killing mechanisms by activated macrophages are still unknown. Recently, increasing attention has been focused on the role of NO as a mediator of a number of physiological reaction. Activated macrophages appear to exhibit some antimicrobial actions as well as antitumor effects via generation of NO, which depends on the L-arginine oxidation pathway. However, it is still unknown whether or not human macrophages generate NO radicals.

Active tuberculosis is now recognized as a frequent and serious complication of infection with the human immunodeficiency virus (HIV), the causative agent of AIDS. Defects in T lymphocyte function result from direct HIV infection of cells expressing the CD4 epitopes, and can severely limit the production of macrophage activating cytokines capable of inducing an anti-mycobacterial state in cells of monocyte lineage. In addition, macrophage themselves are susceptible to HIV infection, and have been shown to be

* From the First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860 Japan.

defective with respect to a variety of host defense functions. Thus, HIV infected individuals underlies the unique susceptibility of HIV infected to tuberculosis.

Key words : Cellular immunity, Cytotoxic T cell, Intracellular Killing mechanisms, AIDS

キーワード : 細胞性免疫, 細胞障害性T細胞, 細胞内殺菌機序, エイズ

緒 言

近年, 結核の免疫学を進歩させた2つの大きな事柄がある。1つは分子生物学的手法をはじめとする種々の技術の進歩であり, 他の1つは AIDS の世界的蔓延である。結核免疫のドグマは細胞性免疫であり, これにはT細胞とマクロファージが主役を演じている。すなわち, T細胞はマクロファージにより提供された結核菌体成分(抗原)を認識して活性化しリンホカインを産生するが, このリンホカインはマクロファージを活性化してその殺菌能を亢進させる。諸種の技術の進歩はこれら細胞間のネットワークをより詳細かつ正確に解析する手段を与え, 多くの研究が進展した。

一方, HIV-1 は, T細胞 (CD4 細胞) のみならずマクロファージにも感染してその数と機能を著しく低下させるために, AIDS 患者においては結核感染2 防御機構が破綻して重症結核を招来し, 現在世界的に多くの問題を引き起こしている。不幸にも AIDS は, 上述の結核免疫のドグマが正しいことを臨床的に実証した出来事といえる。

本シンポジウムにおいて演者に与えられた目的は, 結核免疫の最近の進歩について概説することであるので, まず結核免疫の成り立ちについて簡単に述べ, ついで最近研究が盛んに行われているT細胞のサブセットとその機能, ならびにマクロファージの細胞内殺菌の分子機序について最近の研究の進歩を述べ, 最後に結核免疫と AIDS について概説する。

結核免疫の成り立ち

結核感染は, 多くの場合飛沫感染により起こる。すなわち, 患者から喀出された結核菌はつばきを介して直接的に, あるいは塵埃として間接的に気道に侵入するが, 結核病変の主座である肺胞にまで到達する菌数は通常はわずかに数個であると考えられている¹⁾。これらの結核菌は, 肺胞内に常在する肺胞マクロファージにより貪食され殺菌, 処理される。しかし, 結核菌の数が多かったり, あるいは毒力が強い場合には, 結核菌はマクロファージ内で増殖し, マクロファージを破壊してさらに増殖進展する(感染の成立)。

これを防御するために末梢血より単球が遊走して菌を

貪食するが, このマクロファージは機能的に幼弱であるために殺菌し得ない。これらの幼若マクロファージが結核菌を殺菌するためには, 機能的に活性化される必要がある。その役割をなすのがT細胞である。すなわち, T細胞は活性化してリンホカインを産生し, このリンホカインによって活性化されたマクロファージが結核菌を殺菌, 処理することにより個体は発症を免れる²⁾³⁾。

一方, 初期防御に失敗すると結核菌はさらに血行性からリンパ行性に散布するが, リンパ節ではT細胞がマクロファージにより提供された抗原を認識して活性化され, 早晚細胞性免疫が成立する。一度成立した細胞性免疫がなんらかの理由で破綻し, 病巣内に遺残した結核菌があるとこれが再増殖して再発が起こる(内因性感染)。

T細胞サブセット

マクロファージは結核菌を貪食し, 抗原を細胞膜に保有し, これをT細胞へ提示する。この場合, T細胞は特異的レセプター (TCR) を介してマクロファージの抗原情報をうけとる。T細胞の活性化には, マクロファージが産生する IL-1 が必要である。IL-1 はT細胞を刺激して IL-2 の産生を促す。T細胞から産生された IL-2 は, さらにT細胞の増殖を促す。T細胞が活性化するとマクロファージの分化を促し, 反応性を高める液性因子, すなわちリンホカインを産生する。このような陽性フィードバックにより, さらに免疫反応が進行する⁴⁾⁻⁶⁾。

このように, 結核免疫の本態はT細胞が担っている。このT細胞 (CD3⁺) はさらに CD4⁺ 細胞 (ヘルパー/インデューサ) と CD8⁺ 細胞 (サプレッサー/キラー) に分けられる。CD4⁺ 細胞はさらに結核感染に防御的な作用をするT細胞 (CD4⁺ 感染防御性T細胞) と結核抗原を保有するマクロファージに殺菌的に作用するT細胞 (CD4⁺ 細胞障害性T細胞) に分けられる⁷⁾。また, T細胞レセプター (TCR) の面からは $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞とがある。ここでは結核免疫において最近話題となっている CD4⁺ 感染防御性T細胞, CD4⁺ 細胞障害性T細胞および CD3⁺ $\gamma\delta$ T細胞について述べる。

(1) CD4⁺ 感染防御性T細胞

T細胞の結核病巣における分布をみると, CD4⁺ T細胞が病巣中心部から辺縁部にかけて広く分布しているのに比べ, CD8⁺ 細胞は辺縁部にのみ存在することから,

Table Percentages of Cells in Tuberculous Granulomas by Phenotype

Phenotype	Mean (range)	Pattern ^{a)}
CD3 ⁺	61 (50-75)	A (throughout)
CD4 ⁺	48 (40-60)	A (throughout)
CD8 ⁺	6 (5-10)	B (surrounding)
CD45R ⁺ (naive)	7 (2-15)	B (surrounding)
CDW29 ⁺ (memory)	69 (45-80)	A (throughout)
CD45 ⁺ (memory)	54 (30-70)	A (throughout)

a) Pattern A indicates that positively stained cells were distributed throughout the granuloma. In pattern B, positively stained cells were restricted to the mantle surrounding the granuloma.

(Barnes PF et al J Immunol 142 : 1114, 1989)

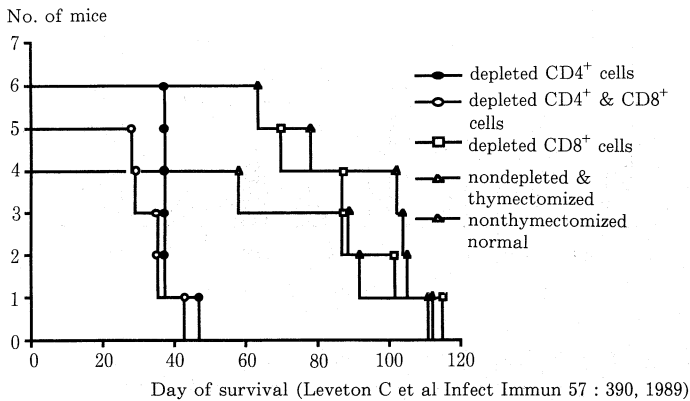


Fig. 1 T cell Subsets in Tuberculosis

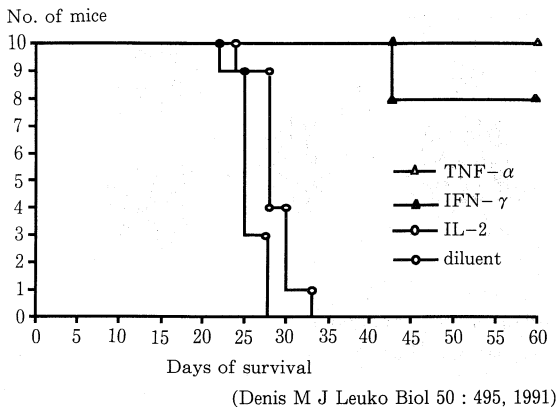


Fig. 2 Cytokines in Tuberculosis

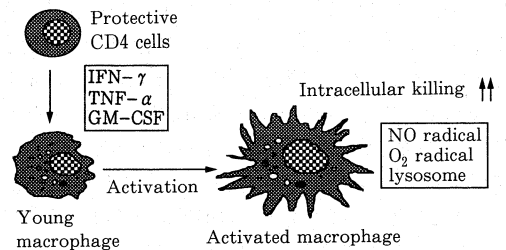


Fig. 3 Cytokines and Macrophage Activation

結核免疫の主役をなしているT細胞はCD4⁺細胞であることがわかる。また、memory T細胞は病巣の中心部に集積するのに対して、naive T細胞は辺縁部にみられる (Table)⁸⁾。マウスを用いた結核感染モデルにおい

て、抗CD4⁺抗体を投与してCD4⁺細胞を除去されたマウスは結核死するのに対し、抗CD8⁺抗体を用いてCD8⁺細胞を除去しても結核感染の経過になんら影響を与えないことから、CD4⁺細胞の重要性を知ることができる (Fig. 1)⁹⁾。

結核病変の場合はT細胞のみならずさまざまなサイトカインが産生されるが、結核感染モデルマウスにおいて

IFN- γ , TNF- α を連続投与された動物は感染死を免れるのに対し, IL-2を投与した場合にはその効果が認められないこと (Fig. 2) から, 結核感染防御に重要なサイトカインは IFN- γ や TNF- α であることがわかる¹⁰⁾。また, 後述するように, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF はマクロファージを活性化させ殺菌系分子の産生能を高めることが *in vitro* において知られている (Fig. 3)¹¹⁾⁻¹³⁾。また, IFN- γ はマクロファージによる DR/1a 表出を増加させ免疫応答に有利な状態を付与することも知られている。

(2) CD4⁺ 細胞障害性 T 細胞

最近 CD4⁺ 細胞障害性 T 細胞の結核免疫における役

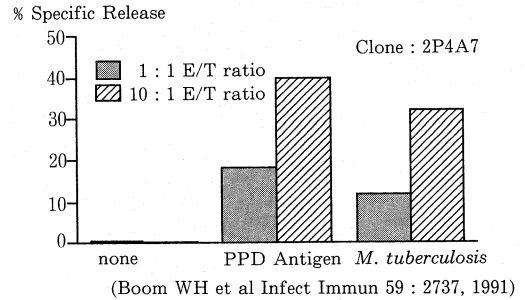


Fig. 4 Monocytes Infected with Live *M. tuberculosis* as Targets for CD4⁺ T-cell Cytotoxicity

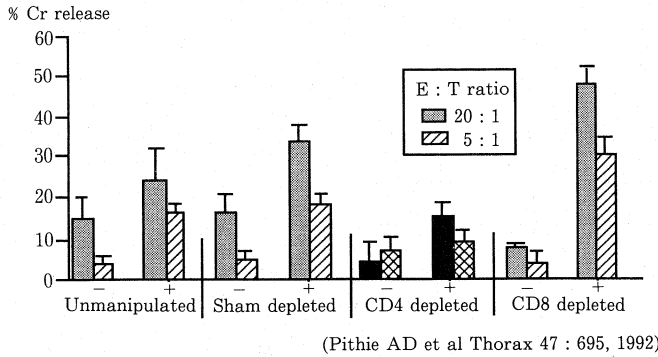


Fig. 5 The Effect of Depleting CD4⁺ or CD8⁺ Lymphoblasts Respectively, on the Ability of PPD Stimulated effector Cells to Kill Autologous Macrophage Targets

割が注目をあびている¹⁴⁾。すなわち, あらかじめ結核菌を食させたマクロファージを ⁵¹Cr で標識したあと活性化リンパ球とともに培養すると, マクロファージはリンパ球により障害され ⁵¹Cr の放出が見られる (Fig. 4)¹⁵⁾。この際抗 CD4⁺ 抗体でリンパ球を処理するとその作用が著しく低下するのに対して, 抗 CD8⁺ 抗体処理では変化がないことから, この際見られる細胞障害作用は CD4⁺ 細胞であることがわかる (Fig. 5)¹⁶⁾。この CD4⁺ 細胞障害性 T 細胞の作用は, 抗 IFN- γ 抗体, 抗 lymphotoxin 抗体, あるいは抗 TNF- α 抗体で処理しても消失せず, 抗 ICAM-1 抗体や抗 LFA-1b 抗体で処理すると失活することから, 接着分子を介した細胞間の直接作用であり, サイトカインは関与していない¹⁵⁾。

CD4⁺ 細胞障害性 T 細胞の結核感染防御における役割としては結核菌をもはや細胞内で殺菌し得ないほどに多量に食しマクロファージを障害することにより結核菌を細胞外に放出させ, その周囲に存在する活性化マクロファージに新たに食菌させることによりマクロファージによる殺菌, 処理をより有効にさせることが考えられる

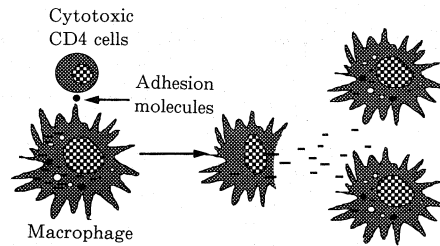


Fig. 6 Mycobacterial Antigen Specific CD4⁺ Cytotoxic T cells

(Fig. 6)。しかしこの機序は一方では細胞壊死による空洞形成機序に関与していることが考えられる。

(3) CD3⁺ $\gamma\delta$ T 細胞

T 細胞には $\alpha\beta$ T 細胞レセプター (TCR) 保有細胞と $\gamma\delta$ T 細胞レセプター保有細胞があり, 結核感染防御には, 上述したように, CD3⁺, $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁺, CD8⁻ T 細胞が主役をなしていることが知られているが, $\gamma\delta$

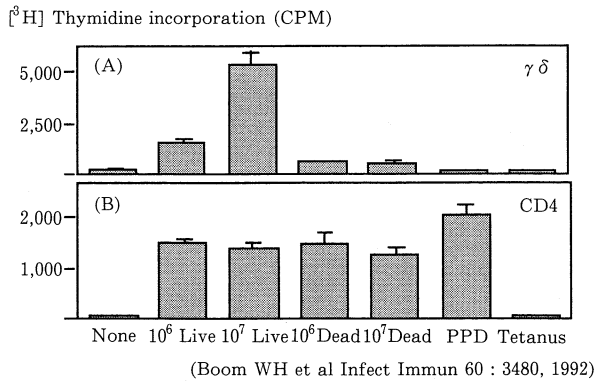


Fig. 7 Proliferative Response of $\gamma\delta$ T cells and CD4⁺ T cells to Mycobacterial Antigens

T細胞の役割については未だ不明な点が多い。しかし最近の報告では、初感染結核病巣内に $\gamma\delta$ T細胞が増加するが、再感染時には増加をみないこと¹⁷⁾、この $\gamma\delta$ T細胞の増加は生菌でみられ菌体成分ではみられないこと (Fig. 7)¹⁸⁾、T細胞やマクロファージの増殖と活性化に必要な各種のサイトカイン (IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) を産生すること、細胞障害性作用を有すること、などから初感染時の防御作用の主役をなしていると考えられる (Fig. 8)¹⁹⁾²⁰⁾。しかし、 $\gamma\delta$ T細胞は memory 機能を持たず、事実再感染時の病巣にはほとんど認められないことから、その作用はあくまでも非特異的であると考えられている。

マクロファージの細胞内殺菌の分子機序

結核免疫の主役をなす細胞はT細胞であることはすでに述べたが、最終的に結核菌を殺菌、処理するのは活性化マクロファージであり、したがってマクロファージの

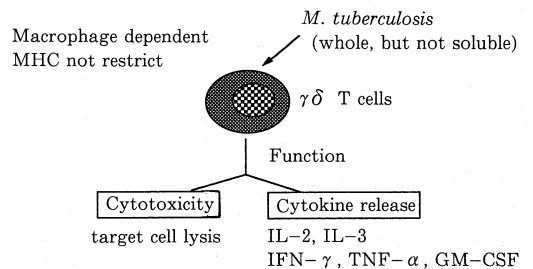


Fig. 8 Activation and Function of CD3⁺ $\gamma\delta$ T cells

活性化と細胞内殺菌機構の解明はきわめて重要である。これまでの諸家の報告では、マクロファージを活性化させるサイトカインとしては IFN- γ , TNF- α , GM-CSF が重要であり¹¹⁾⁻¹³⁾、細胞内殺菌系物質としては O₂ ラジカル, NO ラジカル, リソゾーム酵素が関

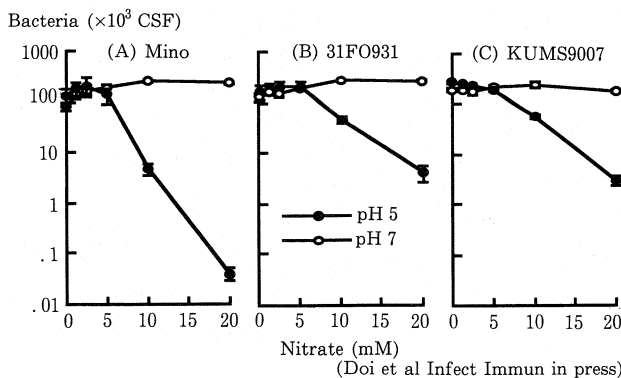
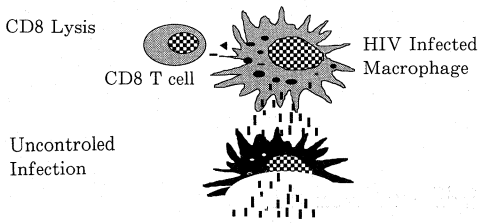


Fig. 9 Difference in Susceptibility among Three MAC Strains toward Nitric Oxide Produced by Acidification of Nitrite



Proposed interaction of T lymphocytes and macrophages at a nidus of mycobacterial infection in the HIV setting (Rose RH Bull Int Union Tuberc Lung Dis 66 : 15, 1991)

Fig. 10 TB in the AIDS Setting : Schematic

与することが知られている。とくに最近では、NOラジカルの重要性が、動物を用いた結核感染モデルで明らかにされている (Fig. 9)¹³⁾²¹⁾⁻²³⁾。1) われわれも IFN- γ で活性化したラットの肺マクロファージが *Mycobacterium avium* complex の細胞内増殖を抑制すること、また菌種により NOラジカルの感受性が異なることを明らかにしている²⁴⁾。しかし、ヒトのマクロファージが NOラジカルを産生するか否かについて現在多くの検討がなされているにもかかわらず、明確な結論は出ていないのが現状である。いずれにしてもマクロファージの細胞内結核菌殺菌機序の分子機序は依然として謎である。

結核免疫と AIDS

HIV 感染は CD4 細胞の進行性の消耗と機能不全であり、マクロファージと単球の機能の低下を伴う²⁵⁾⁻²⁷⁾。T細胞とマクロファージは結核感染防御の中心的役割をになっているので、HIV 感染患者では初感染発病ならびに再感染の危険が高くなる。このことは、すでに疫学的に証明されている。すなわち、AIDS 患者の結核の頻度は一般の 500 倍であり、肺外結核が AIDS 患者で 70% 以上、HIV 感染者で 25-45% と高い。ツ反応陽性者のうち活動性結核になる危険性は 8% にも及ぶ。また、ツ反応は陰性のことが多い²⁰⁾。AIDS 患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中には CD4⁺ 細胞が減少し、かわって CD8⁺ 細胞が増加していることが知られている。これらの CD8⁺ 細胞は、感染マクロファージに対して細胞障害性に働き、肺局所免疫を低下させているものと考えられる (Fig. 10)。このような AIDS 患者にみられる結核の特徴は、結核感染防御機構の重篤な破綻による結末である。

おわりに

先進国で順調に減少していた結核罹患率も、AIDS の出現により再び増加傾向にある。AIDS 患者にみられる結核は従来のものとは異なり全身播種性であり、薬剤耐

性になりやすいなどはなはだ難治性である。まさに、結核における免疫の重要性を如実に示す不幸な出来事である。これらの免疫不全状態にある患者にいかん免疫を付与するかが、今後の大きな臨床的課題であろう。有効なワクチンの開発も含めた結核免疫の研究が大切である。

文 献

- 1) Wiegshauss E, Balasubramanian V, Smith DW : Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 3671-3676.
- 2) Edwards D, Hirkpatrick CH : The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1986 ; 134 : 1062-1071.
- 3) Dannenberg AM, Jr. : Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis.* 1989 ; 11 : S369-S378.
- 4) Piessens WF : Introduction to the immunology of tuberculosis. *Rev Infect Dis.* 1989 ; 11 : S436-S442.
- 5) Kaufman SHE : In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Rev Infect Dis.* 1989 ; S448-S454.
- 6) Collins FM : Antituberculous immunity : new solution to an old problem. *Rev Infect Dis.* 1991 ; 940-950.
- 7) Orme IM, Miller ES, Roberts AD, et al. : T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection : evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol.* 1992 ; 148 : 189-196.
- 8) Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, et al. : Compartmentalization of a CD4⁺ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol.* 1989 ; 142 : 1114-1119.
- 9) Leveton C, Barnass S, Champion B, et al. : T-cell-mediated protection of mice against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 390-395.
- 10) Denis M. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *J Leukocyte Biol.* 1991 ; 50 : 495-501.
- 11) Nakane A, Minagawa T, Kohanawa M, et al. : Interactions between endogenous

- gamma interferon and tumor necrosis factor in host resistance against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 3331-3337.
- 12) Chen Y, Nakane A, Minagawa T : Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice. *Infect Immun.* 1989 ; 57 : 2345-2349.
- 13) Denis M : Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium* : killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukocyte Biol.* 1991 ; 49 : 380-387.
- 14) Ab BK, Kiessling R, van Embden JDA, et al. : Induction of antigen-specific CD4⁺ HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. *Eur J Immunol.* 1990 ; 20 : 369-377.
- 15) Boom WH, Wallis RS, Chervenak KA : Human *Mycobacterium tuberculosis* reactive CD4⁺ T-cell clones : heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 2737-2743.
- 16) Pithie AD, Rahelu M, Kumararatne DS, et al. : Generation of cytolytic T cells in individuals infected by *Mycobacterium tuberculosis* and vaccinated with BCG. *Thorax.* 1992 ; 47 : 695-701.
- 17) Griffin JP, Harshan KV, Born W, et al. : Kinetics of accumulation of $\gamma\delta$ receptor-bearing T lymphocytes in mice infected with live mycobacteria. *Infect Immun.* 1991 ; 4263-4265.
- 18) Boom WH, Chervenak KA, Mincek MA, et al. : Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human $\gamma\delta$ T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1992 ; 60 : 3480-3488.
- 19) Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, et al. : $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. *J Infect Dis.* 1992 ; 165 : 506-512.
- 20) Follows GA, Munk ME, Gatrill AJ, et al. : Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in T cell cultures after activation with bacteria. *Infect Immun.* 1992 ; 60 : 1229-1231.
- 21) Denis M : Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol.* 1991 ; 132 : 150-157.
- 22) Flesh IE, Kaufmann SHE : Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages : role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1991 ; 59 : 3213-3218.
- 23) Chan BJ, Xing Y, Magliozzo RS, et al. : Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992 ; 175 : 1111-1122.
- 24) Doi T, Ando M, Akaike T, et al. : Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect Immun.* 1993 ; 61 : 1980-1989.
- 25) Goodman PC : Pulmonary tuberculosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Thorac Imag.* 1990 ; 5 : 38-45.
- 26) Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, et al. : Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *New E J Med.* 1991 ; 324 : 1644-1650.
- 27) Rose RM : Immunology of the lung in HIV infection : the pathophysiologic basis for the development of tuberculosis in the AIDS setting. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis.* 1991 ; 66 : 15-20.

第 68 回総会シンポジウム

I. 結核研究の進歩 — State of Arts (1)

4. 新抗結核剤への期待 — ターゲッティング療法を含めて

富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫

受付 平成 5 年 8 月 16 日

EXPECTATION OF NEW ANTITUBERCULOUS DRUGS AND TARGETING
THERAPY FOR TREATMENT OF MYCOBACTERIAL
INFECTIONS

Haruaki TOMIOKA *

(Received for publication August 16, 1993)

Recent AIDS endemic causes the worldwide increase in intractable mycobacterial infections including extrapulmonary tuberculosis due to drug resistant organisms and disseminated *Mycobacterium avium* complex infections. Therefore, new antituberculous (antimycobacterial) drugs and development of regimens and protocols for clinical treatment of such mycobacterial infections are urgently needed. Here, I described the present situations of new antituberculous agents, in particular new rifamycin derivatives including rifabutin and benzoxazinorifamycin (KRM-1648), new macrolides such as clarithromycin and azithromycin, and new quinolones including sparfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, fleroxacin, AM-1155 and so on. Their *in vitro* antimycobacterial activities, therapeutic efficacy against experimental infections induced in animals especially in mice, and clinical trials using these drugs are summarized by referring to recent studies by worldwide investigators including us. Moreover, this paper dealt with some of recent attempts for chemotherapy of mycobacterial infections employing the drug delivery system using liposomal microvesicles as a carrier of drugs.

Although these new drugs and development in new regimens appreciably potentiated the efficacy of controlling mycobacterial infections, in particular *M. avium* complex infections, it remains very difficult to achieve a complete elimination of the organisms from the sites of infection, even if provided multi-drug regimens using new drugs having excellent antimycobacterial activity and sufficient dosages. Therefore, it seems important to make an effort to elucidate the mechanisms of induction of immuno-unresponsiveness in hosts in progressed state of mycobacterial infection, as well as to develop new drugs possessing more potent antimycobacterial activity.

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693 Japan.

Key words : Antituberculous drugs, Rifamycin, Macrolide, Quinolone, Targeting therapy, DDS, Liposome

キーワード : 抗結核剤, リファマイシン, マクロライド, キノロン, ターゲティング療法, DDS, リポソーム製剤

緒言

肺結核の初回治療においては, rifampicin (RFP)+INH に streptomycin (SM) または ethambutol (EB) を併用する方式が確立されているが, 短期化学療法あるいはそれに伴う再発の防止, 多剤耐性結核菌による難治性肺結核の治療, また AIDS をはじめとする宿主免疫能の低下に起因する結核や *M. avium* complex (MAC) 症に対処するためにも, 強力かつ交差耐性のない新抗結核剤の開発が望まれる。今回は, 基礎・臨床での評価が進められつつある種々の新抗結核剤と抗酸菌症のターゲティング療法の試みについて, 私たちのこれまでに得られた成績をまじえながら最近の動向を紹介したい。

A. 新抗結核剤

1. Rifamycin 誘導体 : Rifabutin (RBT), rifapentine, FCE 22807, CGP 40/469 A 並びに KRM-1648 (KRM) などが新たに開発され, あるいはその途上にあるが, いずれも RFP よりも優れた *in vitro* 抗菌活性を有する。Table 1 は KRM, RBT および RFP の *in vitro* 抗菌活性を比較したものであるが, KRM の供試運育抗酸菌に対する MIC は, RFP の 1/8~

1/512, RBT の 1/8~1/32 と極めて低い¹⁾。KRM および RBT とともに結核菌に対しては程度の差こそあれ RFP との間に交差耐性がみられるが, RFP 耐性結核菌に対する KRM および RBT の抗結核作用については検討の余地が残されているものと思われる。

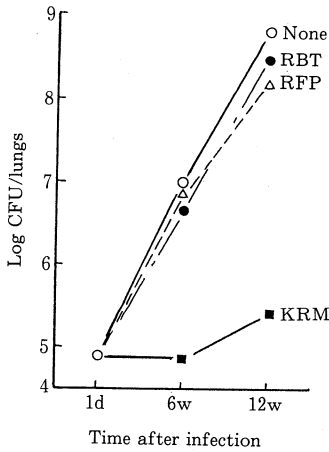
上記の薬剤の中でも特に KRM が優れた抗菌活性を有し, 経口投与下での吸収性, 肺などへの組織移行性および毒性などの点では RFP や RBT などとはほぼ同等であり²⁾, 結核や MAC 症などへの臨床応用が期待されている。久世らによれば, マウス実験結核に対して KRM 単独投与は RFP よりも優れた治療効果を, また KRM + INH + EB の 3 剤併用は RFP + INH + EB の 3 剤併用よりも優れた治療効果を有するという³⁾。私たちの予備検討の成績によれば, KRM には RFP100 γ 耐性菌によるマウス実験結核に対しても優れた治療効果がみられており, 現在これに関する詳細な検討を行っている。

また BALB/c 系, beige および SCID マウス, 免疫不全ラット並びにウサギでの MAC 感染に対して KRM は RFP や RBT に比べて優れた治療効果を有する^{2,4)}。Fig. 1 は beige マウスでの *M. intracellulare* 感染に対する KRM の治療効果をみたものであるが, 肉眼肺病変出現阻止, 肺内感染菌の増殖阻止を指標とした場合, KRM は単独でも極めて優れた治療効果を

Table 1 MICs of KRM, RBT, and RFP against Various Mycobacteria^{a)}

Organisms	Number of strains	MIC ₅₀ (μ g/ml)		
		KRM	RBT	RFP
<i>M. tuberculosis</i>	22	≤ 0.0125	0.025	0.2
<i>M. kansasii</i>	19	≤ 0.0125	0.025	0.4
<i>M. marinum</i>	10	≤ 0.0125	0.1	1.56
<i>M. scrofulaceum</i>	19	0.05	0.2	1.56
<i>M. avium</i> complex	52		0.4	
<i>M. avium</i>	18	0.05		25
<i>M. intracellulare</i>	31	0.05		6.25
<i>M. fortuitum</i>	20	>100	3.13	>100
<i>M. chelonae</i> (abscessus)	15~20	>100	12.5	>100
<i>M. chelonae</i> (chelonae)	20	>100	12.5	>100

a) MICs were determined by the agar dilution method using 7H11 agar medium.



Drug	Dose (mg)	Route	Lung lesions (12w)				
			-	1+	2+	3+	4+
None			0	0	0	0	7
RFP	0.4	po	0	0	0	0	7
RBT	0.4	po	0	0	0	3	4
KRM	0.4	po	0	0	7	0	0

Fig. 1 Therapeutic efficacy of KRM against *M. intracellulare* infection induced in beige mice. Drugs were given to mice infected iv with *M. intracellulare* by gavage, daily six times per week from day 1 to the end of experiment.

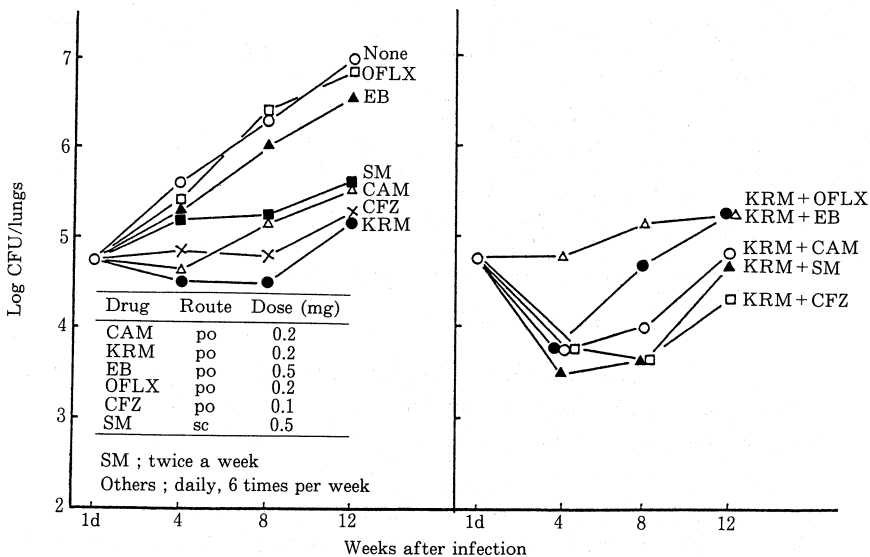


Fig. 2 Therapeutic efficacy of KRM alone or in combination with other drugs against *M. avium* infection induced in BALB/c mice. Drugs were given to mice by gavage, daily six times per week from day 1 to the end of experiment.

示すことが分かった。さらに、ウサギの *M. avium* 感染症では、KRM 投与では RFP や clarithromycin (CAM) に比べて著しい延命効果、生残動物での肺内生菌数の減少、血中よりの菌の消失がみられた⁴⁾。また、Fig. 2 に示すように KRM には CAM, clofazimine (CFZ) または SM との間にマウス実験的 MAC 感染に対する有意な併用効果があり、また久せら³⁾ は KRM + kanamycin (KM) + EB の 3 剤併用において KRM の代わりに、RFP または RBT を用いた併用時よりも

優れた治療効果を有すると述べており、近い将来本剤の結核や MAC 症の多剤併用療法への応用が期待される。

次に臨床面での治療効果について、KRM は未だ臨床試験段階前にあるのでおくとして、RBT についてふれたい。AIDS あるいは Non-AIDS 患者における MAC 症および難治性結核に対する RBT の有効率は 18~37% という報告があり³⁾、RBT は結核のみならず MAC 症への適用も期待されるところであるが、最近 HIV 感染者への RBT のそれらに対する予防的投与が試みられ、

Table 2 MIC_{50S} of Various Drugs for *M. avium* complex : BACTEC 460 TB System

Species	MIC _{50S} (μg/ml)									
	CAM	SM	KM	INH	EB	OFLX	CPFV	SPFX	RFP	RBT
<i>M. avium</i>	2	4	4	2	8	4	2	1	4	0.25
<i>M. intracellulare</i>	0.5	1	2	2	2	16	4	2	0.5	0.125

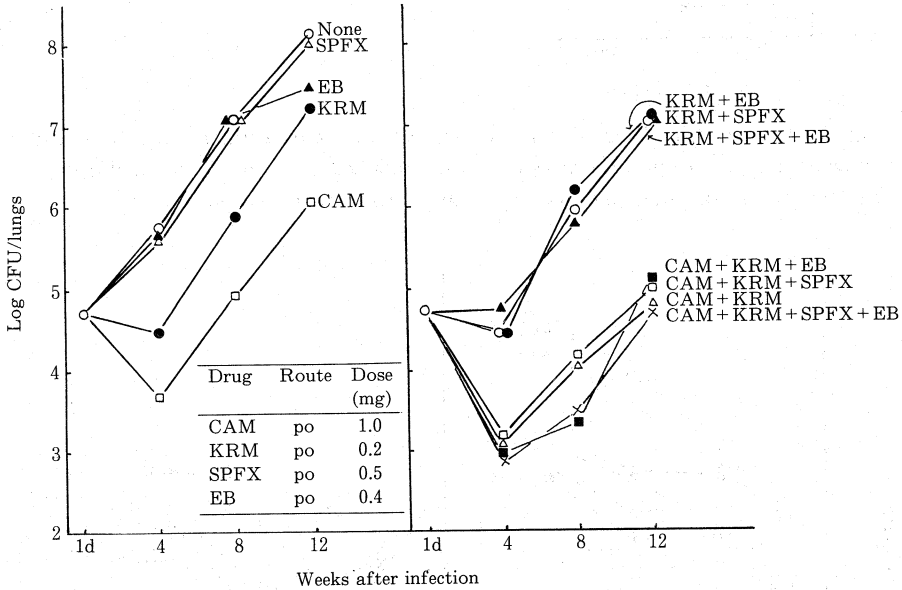


Fig. 3 Therapeutic efficacy of multi-drug regimens containing CAM and KRM against *M. intracellulare* infection induced in BALB/c mice. Drugs were given to mice by gavage daily six times per week from day 1 to the end of experiment.

良好な成績が得られている⁹⁾。また、AIDS患者における全身播種性MAC症に対しては、CFZを含む多剤併用剤にさらにRBTを加えることにより、多少の延命効果、血中からの感染菌の一過性の排除がみられてはいるが、未だ満足すべきものではなく全身播種性MAC症の治療の難しさがうかがわれる。

2. 新マクロライド: CAMを中心に、CAMおよびazithromycin (AZI) が有望視されている。CAMは特にMACに対する*in vitro* 抗菌力に優れ⁷⁾、胃酸に安定で消化管からの吸収・組織移行性にも優れており⁸⁾、マウス実験的MAC感染に対してはCAM、AZIともほぼ同等の治療効果を有し、AIDS患者におけるMAC日和見感染の予防あるいは全身播種性感染の治療において良好な成績が得られている。

CAMは結核菌以外の抗酸菌菌種に対しては比較的抗

菌力が強く、そのMICはerythromycinやroxi-thromycinの各1/16~1/32、1/8~1/16と低く、特にMACに対する抗菌活性が強い。

Table 2はBACTEC 460 TB SystemによるMIC値を示したものであるが、CAMの抗MAC抗菌力はRFPとほぼ同等であり、MBC/MIC比は8~64と大きくその抗菌力はbacteriostaticな傾向が強い。またそのMIC値は供試培地のpHにより大きく左右され、その測定にあたってはこの点に留意すべきである。

CAMとAZIのマウス実験的*M. avium*感染症に対する単独ならびに他剤との併用治療効果を肺・脾内生菌数を指標としてみたKlemensら⁹⁾¹⁰⁾の検討では、200 mg/kgのCAM単独投与で有意な治療効果がみられ、CAMとRBTまたはCFZとの間に併用効果が、さらにCAM+CFZ+EBではより優れた併用効果が認めら

Table 3 Chemotherapy of Disseminated MAC Patients Using CAM and AZI

Drug	Number of Patients	Dose (mg)	Protocol	Results	Adverse effects ^{a)}	Emergence of resistance
CAM	108 (AIDS)	500~2,000	BID (12W)	Blood CFU ↓	15%	15% (> 4μg/ml)
CAM ^{b)}		500~1,000		Blood CFU ↓		90% ^{c)} (> 1,024μg/ml)
CAM ^{d)}	103	1,000~2,000	Once daily (3M)	Culture (-) 20%	6%	NT
AZI	140	600~2,000	Once daily (6W)	Blood CFU ↓ Fever ↓	Occasional	90% ^{c)} (> 1,024μg/ml)

a) Adverse effects of CAM and AZI : GI tract pain, liver enzyme ↑, hearing loss.

b) +EB, CFZ, aminoglycosides.

c) Resistant strains emerged within 10 W, when CAM was given alone.

d) +RMP, CFZ, INH, EB.

Table 4 MIC_{50S} of Various Quinolones for Mycobacteria^{a)}

Species	Test strains	MIC _{50S} (μg/ml) ^{b)}					
		OFLX	CPFEX	SPFX	FLRX	OPC-17116	AM-1155
<i>M. tuberculosis</i>	20-25	0.8	0.4	0.1	3.13	0.8	0.1
<i>M. kansasii</i>	19	0.8	0.4	0.4	3.13	6.25	0.2
<i>M. marinum</i>	10	12.5	0.8	6.25	12.5	25	1.56
<i>M. scrofulaceum</i>	19	6.25	3.13	6.25	12.5	25	3.13
<i>M. avium</i>	18-20	12.5	ND	1.56	50	3.13	1.56
<i>M. intracellulare</i>	20-31	50	ND	6.25	50	6.25	6.25
<i>M. avium</i> complex	56	25	6.25	ND	ND	ND	ND
<i>M. fortuitum</i>	20	1.56	0.1	1.56	3.13	6.25	0.2
<i>M. chelonae</i> (abscessus)	15	>100	6.25	>100	>100	>100	12.5
<i>M. chelonae</i> (chelonae)	20	12.5	0.4	6.25	25	25	1.56

a) MICs were determined by the agar dilution method using 7H11 agar medium.

b) MIC values were determined by several repeated experiments.

れている。われわれもマウス実験的MAC感染症に対するCAMとKRMを含む多剤併用治療効果を肺内細菌数を指標として検討し、CAM+KRMにEBあるいはsparfloxacin (SPFX) またはその両者を加えた場合にはより強い併用効果のあることをみている (Fig. 3)。

Table 3 は1992年の米国のVailでのMACについてのシンポジウム⁶⁾でのCAMとAZIのMAC患者に対する治療効果についての報告をまとめたものであるが、全身播種性MAC症では血中CFUの減少、MAC肺感染症では喀痰培養の陰性化がみられているが、単独投与を続けると、高頻度に耐性菌が出現し、今後他剤との併用治療効果の検討が必要であろう。

3. 新キノロン剤

新キノロン剤の代表的なものとしては、OFLX, SPFX, ciprofloxacin (CPFEX), fleroxacin (FLRX), tosfloxacin (TFLX), AM-1155などが挙げられよう。Table 4は諸種キノロン剤の抗酸菌に対する*in vitro* 抗菌活性の比較成績を示したものである。なかでもCPFEXとAM-1155がほぼ同等の抗菌活性を示した。新キノロン剤は薬剤により差はあるが、結核菌、*M. kansasii*, *M. fortuitum* に対して一般に強い抗菌活性を有する特徴があるが、MACに対してはそれ程有効なものではないようである。またキノロンのMBC/MIC比は2~16とCAMの8~64よりは低く、その抗菌力にはbactericidalな要素が大きいうである。

マウス実験結核に対するOFLXの*in vivo* 抗菌活性

Table 5 Attempts of Controlling Mycobacterial Infections with Liposome-encapsulated antimicrobials

Organisms	Drugs ^{a)}	Authors
<i>M. tuberculosis</i>	SM	Vladimirsky & Ladigina (1982)
<i>M. avium</i> complex	AMK	Eduardo ら (1987)
	AMK	Duzgunes ら (1988)
	RFP	Sito & Tomioka (1989)
	AMK	Cynamon ら (1989)
	AMK	Gangadharam ら (1989)
	GM	Klemens ら (1990)
	KM	Tomioka ら (1991)
	SM	Duzgunes ら (1991)

a) SM, streptomycin ; AMK, amikacin ; RFP, rifampicin ; GM, gentamicin ; KM, kanamycin.

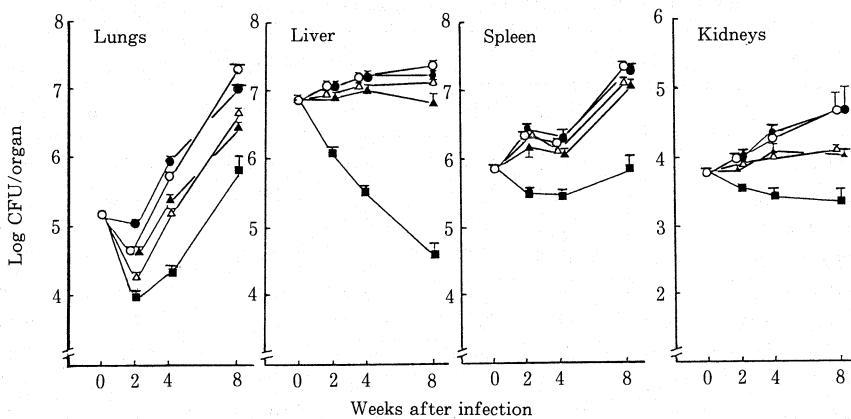


Fig. 4 Change in the viable number of *M. intracellulare* in the visceral organs of mice with or without liposome-entrapped KM treatment. KM in free or liposomal form was given at the dose of 70 to 80 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{injection}$. ○, None ; ●, empty liposome ; △, KM ; ▲, liposome mixed with KM ; ■, liposome-entrapped KM.

については、東村¹¹⁾の報告では1 mg/mouseの投与で肝内生菌数の減少が、また Truffot-Pernot, Grosset¹²⁾の成績によれば、150 mg/kg投与でマウスの生存率の増加と脾内CFUの若干の低下が認められており、OFLXのマウス実験結核に対する有効性については現在では一応意見の一致がみられている。また、斎藤ら¹³⁾によれば、*M. fortuitum*感染に対してはCPF X, OFLX, norfloxacin (NFLX)の順に優れた治療効果がみられたという。またOFLXは*M. kansasii*感染症に対してはかなり有効であるが¹⁴⁾、MAC感染症にはあまり有効とは言えないという成績も得られている¹⁵⁾。

以上、近年種々の新キノロンが相次いで開発され、ま

た今なおその途上にあるようであるが、これらは既存の抗結核剤との間に交差耐性を示さず¹⁶⁾、OFLXを含む多剤併用による治療によって難治性結核の持続排菌例の14~50%に培養陰性化したとする報告があり¹⁷⁾、さらに抗菌力の優れたキノロンの開発が待たれるところである。

B. 抗酸菌症の治療におけるターゲティング療法の試み

近年、リポソームなどのmicrovesicleに封入した薬物によるdrug delivery system (DDS)が開発され、amphotericin B, SM, sisomycinなどの薬剤をリポソームに封入して感染症の治療への応用が試みられ、良

好な成績が得られている。DDSは薬剤の放出の制御および薬剤の部位到達と細胞膜などの障壁透過を目的としたいわゆるターゲティングといった2つの機能要素からなっている。DDSの利用の必要性和利点には薬剤の毒性の軽減、薬効の持続、薬剤の細胞内、臓器内・病巣内への移行性の増加などがあり、特にリポソーム製剤の場合、アミロペクチンやプルランなどの多糖コーティングリポソームでは肺や肝への移行性が選択的に高まることが知られている¹⁸⁾。また、細胞内への移行性の低い薬剤である penam, cefem, アミノ配糖体抗生物質などはリポソームへ封入することにより膜細胞内への取り込みが増強される¹⁸⁾。

抗生剤封入りリポソームによる感染に対する治療の試みとしては実験的マウス *Leishmania*, 真菌, *Salmonella*, *Listeria* および *Legionella* 感染症などが報告されており、封入薬剤の *in vivo* 抗菌活性の増強あるいは毒性の軽減が報告されている。Table 5 は抗生剤封入りリポソームによる実験的マウス抗酸菌感染の治療についての主な報告例をまとめたものであるが、結核とMAC感染には特にリポソーム封入アミノ配糖体抗生物質についての検討が主であるが、いずれも著効がみられている。Fig. 4 はわれわれが¹⁹⁾ リポソーム封入KMによるマウスMAC感染治療実験を行った成績を示したものであるが、臓器内、特に肝内生菌数の減少からみて、KMをリポソームへ封入することによってその治療効果が増強されることが明らかであり、この効果はRFPをリポソームに封入した場合²⁰⁾ よりも大きかった。

以上、リポソームはmicrovesicleのサイズや脂質組成を変えるか、多糖でコーティングすることなどでその組織移行性を制御することが可能であり、さらにMDPやIFNなどのbiological response modifier (BRM)を組み込んだリポソームを用いることにより宿主の免疫能の亢進をも十分に期待できるものと思われる、今後難治性抗酸菌症の治療にはこの方面の検討も必要となる。

結 語

新抗結核薬の現況についての最近の知見を、著者らの成績をまじえながら解説した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、薬剤の提供を頂いた鐘淵化学工業、第一製薬、大日本製薬、杏林製薬、大正製薬、フェルミタリアカルロエルバ、バイエル薬品、日本レダリー株式会社に深謝します。また、斎藤肇教授のご校閲に謝意を表します。

(共同研究者：斎藤 肇，佐藤勝昌，江森方子，日高隆義)

文 献

- 1) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. : *In vitro* antimicrobial activities of newly synthesized benzoxazinorifamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 ; 35 : 542-547.
- 2) Tomioka H, Saito H, Sato K, et al. : Chemotherapeutic efficacy of newly synthesized benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ; 36 : 387-393.
- 3) 久世文幸, 山本 誉, 網谷良一, 他 : 新 rifamycin 誘導体の *Mycobacterium tuberculosis* と *M. avium* complex に対する *in vivo* 活性, 結核. 1991 ; 66 : 7-12.
- 4) Emori M, Saito H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of the benzoxazinorifamycin KRM-1648 against experimental *Mycobacterium avium* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 722-728.
- 5) O'Brien RJ, Anne M and Snider DE, Jr : Rifabutin (ansamycin, LM427) : A new rifamycin-S derivative for the treatment of mycobacterial diseases. *Rev Infect Dis.* 1987 ; 9 : 519-530.
- 6) *Frontiers in mycobacteriology : M. avium, The Modern Epidemic*, Vail, Colorado, U.S.A, 1992.
- 7) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : クラリスロマイシンの *in vitro* および *in vivo* 抗マイコバクテリア活性, 結核. 1993 ; 68 : 293-299.
- 8) Hardy DJ, Guay DRP, and Jones RN : Clarithromycin, a unique macrolide. A pharmacokinetic, microbiological, and clinical overview. *Dign Microbiol Infect Dis.* 1992 ; 15 : 39-53.
- 9) Cynamon MH, and Klemens SP : Activity of azithromycin against *Mycobacterium avium* infection in beige mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ; 36 : 1611-1613.
- 10) Klemens SP, DeStefano MS, Cynamon MH : Activity of clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ; 36 : 2413-2417.
- 11) Tsukamura M : Antituberculous activity of

- ofloxacin (DL-8280) on experimental tuberculosis in mice. *Am Rev Respir Dis.* 1985 ; 132 : 915.
- 12) Truffot-Pernot C, Ji B, Grosset J : Activities of pefloxacin and ofloxacin against mycobacteria : *in vitro* and mouse experiments. *Tubercle.* 1991 ; 72 : 57-64.
- 13) 斎藤 肇, 佐藤勝昌, 富岡治明, 他 : 諸種抗酸菌に対する norfloxacin, ofloxacin 及び ciprofloxacin の *in vitro* 並びに *in vivo* 抗菌活性, 結核. 1987 ; 62 : 287-294.
- 14) Tomioka H, Saito H, Sato K : Therapeutic efficacy of new quinolones, ofloxacin and ciprofloxacin, against *Mycobacterium kansasii* induced infection in mice. *Chemotherapy.* 1990 ; 38 : 1180-1186.
- 15) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : Sparfloxacin の抗マイコバクテリア活性, 結核. 1991 ; 66 : 643-649.
- 16) Leysen D, Haemers A, Pattyn SR : Mycobacteria and the new quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; 33 : 1-5.
- 17) 青柳昭雄 : 結核症の治療の進歩, 化学療法の領域. 1989 ; 5 : 640-648.
- 18) 朝長昭光, 広田正毅, 原 耕平 : 感染症のターゲット療法, 最新医学. 1985 ; 40 : 1866-1872.
- 19) Tomioka H, Saito H, Sato K, et al. : Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated kanamycin against *Mycobacterium intracellulare* infection induced in mice. *Am Rev Respir Dis.* 1991 ; 144 : 575-579.
- 20) Saito H, Tomioka H : Therapeutic efficacy of liposome-entrapped rifampin against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; 33 : 429-433.

医療関係者の結核予防対策について

日本結核病学会予防委員会

近年、医療関係者の結核感染・発病のリスクが一般住民のそれよりも高いことが知られるようになってきた。これは若年者の中の未感染者の割合が増大したこととあいまって、結核の診断が遅れがちになっていること、重症で発病する結核患者が一向に減らないこと、そして恐らくはBCG接種による免疫が不十分な者の割合が多くなっていることなどがその背景にあるものと考えられる。

このように医療関係者は結核に感染し発病する危険が大きい一方、他に感染を及ぼす恐れの高い職種であることから、その結核予防に関しては特別の措置が講ぜられるべきである。当委員会は関連する現状を分析した結果、今後の予防対策の指針を示すこととした。

平成5年9月

日本結核病学会予防委員会

委員長	志村昭光			
委員	荒川正昭,	五十里	明,	石橋凡雄
	大島駿作,	鎌田	達,	久世彰彦
	佐藤博,*	森	亨,	柳川洋
				(*印:前委員長)
前委員	永井明彦,	本宮雅吉		

1. 対策の現状

ここで対象とする「医療関係者」には医療に携わるすべての職種を含む。

医療関係者には他の職種と区別される結核予防のための特別な法的な規制はなく、結核予防法に定められた以外の結核予防対策の実施は管理者の裁量にゆだねられている。その結果、医療関係者の入学時・採用時ならびに定期健康診断の実状は内容的にかなり不十分な施設の多いことが懸念される。

また医療機関で結核患者が発生した場合、患者と濃密な接触があり感染の危険度が高い職員に対しては当然なんらかの措置が必要であるが、定期外健康診断などの実施は十分なものとはいえない。

2. 勸告

(1) 対策実施の義務と監督責任について

1. 医療機関の管理者は、結核予防法及び労働安全衛生法などに基づく各種の健康診断の受診機会を確保し職員などの安全衛生管理の徹底を図らなければならない。

2. 医療関係者養成施設（看護学校など）の管理者は、結核未感染者の増加に鑑み医療機関などでの実習前にツベルクリン反応検査及びBCG接種などの必要な措置を講じなければならない。

3. 医療機関においては「結核感染防止委員会」（仮称）またはこれに相当する組織を設置し、結核感染の未然の防止と患者発生時の組織的な対応にあたることが望ましい。

4. 保健所長は医療機関において結核患者が発生した際には、「結核定期外健康診断ガイドライン」に基づき適切な措置を講じなければならない。

(2) 定期健康診断・予防接種

医療機関などにあっては法令に基づく健康診断の確実な実施はもとより、結核の感染ならびに発病の防止の効果を一層確かなものにする方策を講ずべきである。

①医療関係者養成施設（看護学校など）

1. 入学時に結核の既往歴ならびに過去における結核の定期及び定期外健康診断と予防接種の成績を把握する。

2. 入学時の健康診断にはツベルクリン反応検査を実施し、その結果が陰性及び結核未感染と考えられる者にはBCG接種を行い翌年再度ツベルクリン反応検査を行う。

3. 入学時ならびに定期健康診断に際しては、年齢（19歳未満の者を含む）及びツベルクリン反応検査の成績にかかわらず胸部エックス線検査を実施する。

②医療機関

1. 採用時に結核の既往歴ならびに過去における結核

の定期及び定期外健康診断と予防接種の成績を把握する。

2. 雇入時の健康診断に際し30歳未満の者にはツベルクリン反応検査を実施し、その結果が陰性及び疑陽性の場合には概ね2週間後に再度ツベルクリン反応検査を行い、再び陰性及び結核未感染と考えられる者にはBCG接種をする。このときBCG接種を受けた者には1年後にツベルクリン反応検査を実施する。

雇入時ならびに定期健康診断に際しては、法令の定めにより全員に胸部エックス線検査を実施する。

(3) 定期外健康診断

医療関係者が結核を発病した場合、または受診中の患者が結核と診断され職員への感染の危険度が高い場合は、管理者は所轄保健所へ通報するとともに院内に設置した結核感染防止委員会で検討に付する。

委員会は感染源の確認、未発見患者の追求、被感染者の発見、関連した情報の収集、今後の対策などについて検討するが感染源の人権とプライバシーに十分な配慮を要する。

これらは保健所が「結核定期外健康診断ガイドライン」に基づいて行う一連の措置への積極的な協力の一環として行う。

(4) 化学予防

1. 30歳未満の者であって、入学時または採用時の胸部エックス線検査で陳旧性結核の所見を認めかつ治療歴もしくは化学予防歴のない場合、及びツベルクリン反応検査の発赤径が40mm以上あり発病の危険度が高いと考えられる場合には必要により化学予防を行う。

2. 医療機関での患者発生に際しての定期外健康診断で結核感染の疑いがある者には年齢にかかわらず化学予防を実施することが望ましい。

(5) 流行監視

1. 結核感染防止委員会は、当該施設関係者の入学時、雇入時及び定期健康診断の受診状況及び結果を毎年精査し院内感染の有無を判定する。

2. 院内に結核感染を認めた場合は直ちに所轄保健所へ通報し、関係者に対し必要な措置を行わなければならない。

3. その他

(1) 医療機関内感染防止対策マニュアルの作成

医療関係者の結核感染及び結核発病の未然防止と集団感染防止の観点から、「感染防止対策マニュアル」の作成を本委員会においても検討する。

(2) 結核菌検査などに関する感染防止

結核菌や結核菌を含む検体を扱う職員の感染防止については、設備・操作の面に関して日本細菌学会及び日本病理学会の安全基準などを遵守する。

(3) 医療関係者に対する啓発

都道府県は医師会などの協力を得て、結核対策特別促進事業などの活用を図ることにより、医療関係者に対する例えば次のような研修会などを実施する。

1. 医師に対する結核講演会の計画的な開催
地区医師会単位の講演会，二次医療圏単位の講演会，
県下全域の講演会
2. 医療関係職種に対する実務的研修会の計画的な開催
検査技師の結核菌検査手法，看護婦・保健婦・衛生管
理者などの結核関連研修

以上