

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406034

研究課題名(和文) バングラデシュにおける小児結核診断に関する研究

研究課題名(英文) Improved diagnosis for pediatric tuberculosis in Bangladesh

研究代表者

我妻 ゆき子 (Wagatsuma, Yukiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40400676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：小児結核の蔓延しているバングラデシュで、既存の方法では正確な診断が困難な小児結核に関して、尿や血液による最新の診断法を応用導入し有効性を検証することを目的とした。塗抹、培養、核酸増幅法の全ての検査を実施した結核疑い97例のうち、24例が何らかの検査で陽性であり、塗抹検査のみで陽性である11例に対してMGIT培養にて7例、呼吸器検体の核酸増幅法にてさらに5例、尿のTB-LAMPでさらに1例の追加診断効果が示された。この研究により、塗抹検査のみの場合に対して、液体培養及び核酸増幅法検査を呼吸器由来検体や尿検体に併用することにより、2倍以上の細菌学的診断が得られることが示された。

研究成果の概要(英文)：The objectives of the study were to evaluate the feasibility of using urine-based techniques for the diagnosis of tuberculosis among children and to compare the effectiveness of new diagnostic tools against the existing clinical tools for diagnosis of tuberculosis in children. Among 97 suspected cases that were examined for all tests, 24 cases were positive for any tests. Although only 11 cases were smear positive, additional 7 cases by MGIT, 5 cases by PCR using respiratory samples, and 1 case by TB-LAMP using urine samples were further identified. This study showed diagnosis capacity could increase to double by applying respiratory and urine samples for liquid culture and PCR.

研究分野：臨床疫学

科研費の分科・細目：内科学、小児科学

キーワード：国際研究者交流 国際情報交換 バングラデシュ 小児科学 感染症 結核 臨床研究 公衆衛生

1. 研究開始当初の背景

かつて国民病と言われた結核も、日本人にとり今や「昔の病」と考えられがちである。しかし、世界全体では人口の約3分の1(20億人)が結核既感染者と推定され、発症数はアジアに半分以上が集中している。世界三大感染症の一つであり、正式な登録数だけでも、世界で年間約1千万人が発症し、200万人が死亡している。アフリカではおもに近年のHIV感染に伴うものであるが、アジアではその多くが貧困や栄養不全と関連している。BCGは乳幼児期の粟粒結核を予防するが、その後の肺結核予防には限界がある。患者個人のみならず、社会にとっても大きな損失と苦しみをもたらす一方、治療可能な疾患である。世界的な取り組みとして結核の蔓延を止め、地域の社会経済的活動を促進させるために、1991年にWorld Health Assemblyにて「喀痰塗抹検査にて新規結核患者発見率70%以上」、「新規患者の治療成功率85%以上」を目標として掲げた。1995年には、DOTS(Directly Observed Treatment, Short course)が世界における結核対策のポリシーとして導入された。また、薬剤耐性結核菌発生の問題は日本を含め深刻なグローバル課題である。

結核蔓延国において15歳以下の小児は、結核感染者の20%と推定されるが、小児においては、結核対策は明らかに遅れをとっており、積極的介入は何もしていないのが現状である。小児結核は症状が非特異的であり、成人のように胸部レントゲンにて空洞形成などの典型的なパターンを呈さず、また喀痰を喀出することが困難なため、診断にとって重要な喀痰の塗抹や培養のための検体採取ができず状況を難しくしている。これらに加え、途上国では低栄養状態が蔓延しており、そのことが症状を重篤化させるとともに、ツベル

クリン反応の偽陰性などを招き、結核と低栄養の悪循環を招いている。WHOの小児結核ガイドラインによれば胃液培養と臨床スコアリングを診断基準としているが、胃液培養は検体採取の難しさからほとんどなされていない。よって、ストップ結核世界計画目標を達成するには、正確かつ簡便で、より早期の診断が小児や低栄養状態でも使用できる手法が必要とされている。

結核対策改善において大きな障壁となっていることの一つは、患者発見率が低いということである。低所得国において、抗酸菌の喀痰塗抹検査は、肺結核の診断に唯一かつ広く利用されている検査であるが、抗酸菌の喀痰塗抹検査の感度は、50-60%と低い。また、喀痰塗抹検査陰性であっても、培養陽性であれば、そのような患者の17%は感染性があると報告されている。よって、喀痰塗抹陰性患者に対する確定診断は大きな課題となっている。さらに、低い患者発見率に加え、不適切な化学療法、耐性結核菌の出現が国家レベルでの結核対策の妨げにつながっている。

2007年にWHOは小児結核研究に関する優先課題を発表し、小児結核診断に対する新しい診断法の開発とその有効性検証を最重要課題の一つとして挙げた(WHO, 2007)。LAMP法などの核酸増幅法(Nucleic Acid Amplification Tests: NAATs)やlipoarabinomannan(LAM)抗原などを用いた抗原検出法は、いくつかのものが開発段階にあり、現在の感染状態を過去の既往から分けて診断できるものとして期待されている。また、尿検体からの検出も有望視されており、実際の診療の現場での簡便な検査として期待されている。IGRA(Interferon-Gamma Release Assay)は開発後間もないため、試薬特性に関する研究はまだ十分になされていない

ないのが実情である。IGRA の原理を利用した検査方法にはクオンティフェロン (QFT) と T-SPOT.TB(T-SPOT)がある。日本においては QFT が厚生労働省の承認を得て販売されているが、いくつかの課題を残している。課題としては、1) 細胞性免疫能が低下している可能性の高い小児、高齢者、HIV 感染、糖尿病、免疫抑制剤使用者における診断能力の限界、2) 結核感染者における結核菌の存在状態(活動性、潜伏性)の判定や、3) 感染もしくは発症後から治癒に移行する予測の可否などがあげられる。

2 . 研究の目的

これまで筑波大学小児科学と臨床疫学グループは、国際医学研究パートナーとともに小児感染症の重症化予防のための臨床疫学や診断治療アルゴリズムに関する研究を積み重ねてきた。本研究では、小児結核診断に関する研究として、結核予防会結核研究所と開発企業との共同研究として、バングラデシュの国際医学研究機関である国際下痢症研究センター (ICDDR, B) にて臨床疫学研究として実施した。LAMP 法、LAM 法や IGRAs などによる尿や血液を使用した新しい感染診断技術の蔓延国フィールドでの有効性を検証することを目的とした。

本研究では、結核蔓延地域であるバングラデシュを研究調査地として、従来の臨床診断法である喀痰塗抹検査、培養検査に加え、LAMP 法、LAM 法や IGRA 法などの最新診断技術を使用し、それらの有効性を検証した。それぞれの検査法での感度と特異度を算出し、小児に対して最適の診断アルゴリズムを提案することを目指した。研究に必要なサンプル数に関しては、臨床所見スコアリングシステムの精度に影響を受けることが知られているが、すでにバングラデシュでは、国際下

痢症研究センターによって、10 万人規模での地域スクリーニングによる小児結核罹患率調査が昨年度実施されたところであり、WHO の提唱する臨床スコアリングシステムの標準化については現地にノウハウ経験が蓄積されている。

これまで小児結核蔓延地域において、LAMP 法と IGRA を同時に検証した研究はなく、どの検査法がどのような小児、たとえば幼少期や低栄養による免疫不全状態の小児に対して使用できるのかを検討した研究はなかった。また、耐性株による影響なども世界の注目するところであるが、これらの新規小児結核診断法の有用性と耐性株との関連についてはまだ報告がない。筑波大学と結核研究所、ICDDR, B との共同研究により、これらの検査法の小児結核における有効性が明らかとなれば、WHO の臨床スコアリングシステムとともに診断治療のアルゴリズムの重要な要素となることが期待できる。

3 . 研究の方法

(1) 調査研究実施国及び地域

バングラデシュの首都ダッカにある国際医学研究機関である国際下痢症研究センター (ICDDR, B) のダッカ病院と、国立胸部疾患診療所 (シャモリクリニック) との共同研究にて実施された。胸部疾患診療所はバングラデシュの首都ダッカにあるもっとも大きな国立結核治療センターであり、ICDDR, B はバングラデシュ国家結核対策のレファレンスラボとなっているため、シャモリクリニックからの検体は常時アクセスが可能なシステムとなっている。結核の検体検査は、すべて ICDDR, B の結核ラボラトリーで実施された。このラボラトリーは WHO の規定する国際水準を満たす結核研究施設である。耐性株の分子生物学的研究についてもこれまでに実施されてきた。

(2) 対象と方法

対象患者は ICDDR,B ダッカ病院あるいは Shyamoly TB clinic を受診した 15 歳未満の患者で、3 週間以上の咳嗽、微熱、体重減少、食欲不振、一般抗生物質に反応しない肺炎などから結核の疑いのある者とした。また、陰性コントロールとして上記所見のない小児を対象とした。結核の治療中あるいは既往のあるものは除外した。

検体として早朝痰（8 歳以下の小児では誘導痰）あるいは胃液を採取した。検体は NALC-NaOH 処理後に遠心集菌（3,000xg, 20 min）し、沈渣を用いてチール・ネールゼン（Z-N）染色による塗抹鏡検と MGIT 培養を実施した。さらにこれらの検体から核酸を抽出し、IS6110 及び MPB64 を標的とする結核菌特異的 PCR 反応と、TB-LAMP（栄研化学）による結核菌の遺伝子検出を実施した。

中間尿を無菌的に採取し、尿中 Lipoarabinomannan (LAM) 抗原の検出を Clearview TB ELISA kit (Alere medical, USA) あるいは Alere Determine™ TB LAM Ag kit (Alere medical, USA) を用いて実施した。さらに尿中からも核酸を抽出し、喀痰/胃液検体と同様に遺伝子検出を実施した。さらに被験者から末梢血 5 ml を採取し、QuantIFERON-TB Gold in tube (QFT-GIT, Celestis, Austraria) 及び T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK) も施行した。また、尿中 LAM 抗原陽性あるいは非結核性抗酸菌の培養がいずれかの検体で陽性となった患者については、コントロールを含めてキャピリア MAC 抗体 ELISA (タウンズ) を使用して検体中の抗 GPL core IgA 抗体の測定を行った。

研究対象者の最終診断を以下のカテゴリーとして分類し、診断精度を検討した。

診断カテゴリー

結核と確定された群 (Definite TB) : 抗酸菌塗抹陽性あるいは結核菌群培養陽性である患者

結核と推定された群 (Probable TB) : 胸部 X 線画像、症状、抗結核薬療法による治療経過から結核が強く疑われるが、結核菌群が細菌学的に証明されていない患者

結核以外と診断された群 (Non-TB) : 他の疾患である証拠がある者、抗結核薬治療に反応しない者、自然治癒した者

陰性対照 (コントロール) 者

4 . 研究成果

166 例について組み入れを行った。評価時点での結核患者（確定及び推定）は 79 人、結核以外の患者（経過観察中を含む）は 49 人、陰性対照者（コントロール）は 38 人であった。評価対象者の平均年齢は 5.1 ± 4.5 (range: 0.1 - 14.1) 歳であった。Z-N 染色による塗抹鏡検 ($n = 138$) では、コントロール 20 例で全て陰性であるのに対して、結核群では 15.8% (11/70) で陽性であった ($p = 0.132$)。喀痰（誘導痰）あるいは胃液の MGIT 培養では、結核患者群で 15 人 (22.1%, 15/68) が結核菌群陽性であり、当然ながら他の群では結核菌培養陽性は認められなかった。一方で結核以外の疾患とされた患者 41 人のうち 2 人 (4.9%) から *M. intracellulare* が、コントロール群 20 人から *M. fortuitum*、*M. scrofulaceum*、MOTT (species unidentified) がそれぞれ 1 例ずつ陽性となっていた。非結核性抗酸菌が分離された 1 例を含む 19 例（結核 4 例、結核以外 9 例、コントロール 5 例）で抗 GPL core IgA 抗体を測定したが、全て陰性であった。

喀痰あるいは胃液の核酸増幅法では、結核患者群で IS6110 陽性が 17.4% (12/69)、MPB64

陽性が 18.8% (13/69)となった。一方で結核以外の疾患とされている患者群で IS6110 陽性が 2.1% (1/48)、MPB64 陽性が 4.2% (2/48) 観察された。同様に TB-LAMP では結核患者群で 27.5% (19/69)が、結核以外の疾患とされている患者群で 4.4% (2/45)が陽性であった。IS6110 及び MPB64 に対する TB-LAMP の感度について ($p = 0.153$ and $p = 0.226$) 有意差はなかった。

尿検査では LAM 抗原の検出が 161 例中 29 例で陽性 (18.0%)、120 例で陰性 (72.3%)、12 例 (7.2%) で判定不能であった。結核患者群では 78 例中 13 例 (16.7%) が尿中 LAM 陽性で、結核以外の疾患とされている患者 48 例中でも 9 例 (18.8%) 陽性、コントロール群でも 35 例中 7 例 (20%) が陽性であった。これら 3 群で陽性率に差はなかった ($p = 0.902$)。これに対して、尿による TB-LAMP では 151 例中 7 例が陽性 (4.6%)となったが、陰性コントロールでは全例陰性であった。結核患者 76 例中 5 例で陽性 (感度 6.6%) であり、現時点で結核以外の疾患と診断されている患者を確定例とすると、特異度は 95% (38/40)となった。

血液検体による Interferon Gamma Release Assay (IGRA) では、QFT-GIT が結核例 70 例中 39 例で陽性であった (陽性 55.7%, 陰性 44.3%, 判定不可 0%) のに対して、コントロールでは 6 例のみ陽性 (陽性 26.1%, 陰性 65.2%, 判定不可 8.7%) であり、統計的有意差を認めた ($p = 0.0003$)。T-SPOT.TB でも同様に結核例 58 例中 22 例で陽性であった (陽性 37.9%, 陰性 53.5%, 判定不可 8.6%) のに対して、コントロールでは 5 例のみ陽性 (陽性 15.2%, 陰性 84.9%, 判定不可 0%) であり、統計的有意差を認めた ($p = 0.008$)。QFT-GIT よりも T-SPOT.TB において感度が低い傾向であった ($p = 0.119$)。

塗抹、培養、核酸増幅法 (喀痰/胃液及び尿) の全ての検査を実施した結核疑い 97 例のうち、24 例が何らかの検査で陽性であり、塗抹検査のみで陽性である 11 例に対して MGIT 培養にて 7 例、呼吸器検体の核酸増幅法にてさらに 5 例、尿の TB-LAMP でさらに 1 例の追加診断効果が示された。

Modified Kenneth Jones Score は結核患者群で平均 5.16 (95% CI 4.77-5.56) であり、結核以外の疾患とされた患者群では平均 2.69 (95% CI 2.35-3.04) であった。これら 2 群のスコアには有意差が認められた ($p < 0.0001$)。Score 5 をカットオフとした場合の結核診断感度は 75.9% (60/79) であり、特異度は 91.8% (45/49) であった。Score 4 以下の対象者の中にも培養、核酸増幅法のいずれかで結核菌陽性となっている患者が 5 例認められた。

今回の研究により、塗抹検査のみの場合に対して、液体培養及び核酸増幅法検査を呼吸器由来検体や尿検体に併用することにより、2 倍以上の細菌学的診断が得られることが示された。一般に塗抹検査に対する培養と核酸増幅検査の追加効果は 20~40%程度とされており、今回の結果からは小児における集学的検査の効果が成人よりも高い可能性が示唆された。尿中 LAM 抗原は HIV を中心とする免疫不全患者で陽性率が高いことから、細胞性免疫の未熟な幼少児での検出感度が期待されたが、今回の研究対象者では結核以外の患者やコントロール群においても結核患者と同等の陽性例が認められ、結核診断上の臨床的有用性は乏しいと考えられた。LAM 抗原は非結核性抗酸菌にも陽性となることから、結核以外の抗酸菌感染の可能性が一つの原因として考えられたため、ひとつの可能性として MAC ELISA 抗体測定キットを用いて一部の検体を評価したが、現在までに抗 GPL core

IgA 抗体を測定した検体で 1 例も陽性が示されていない。小児における MAC ELISA キットの診断精度は確立されていないので確定的ではないが、*M. avium* complex や迅速発育菌が分離されていても基本的には環境汚染であり、明らかな感染ではないと考えられた。また、結核以外と診断されている患者の尿で 2 例の TB-LAMP 陽性が観察されたが、経過観察中であり、非特異的な反応、あるいはこれらの患者が結核である可能性が考えられる。

IGRA は途上国に於いて推奨されていないが、特に結核菌既感染率が低いと思われる小児においては有用性があるものと考えられ、今回 QFT-GIT 及び T-SPOT.TB について検討した。コントロール群あるいは非結核性疾患群で結核患者群よりも有意に IGRA 陽性率が低く、さらに QFT-GIT の方が T-SPOT.TB よりも感度が高い傾向であった。この結果は途上国においても小児結核を疑う上で IGRA が有用であることを示している。また、これまで T-SPOT.TB のほうが感度が高いという報告が多いが、今回の結果はそれとは異なる結果であり、さらに検討が必要であると考えられた。

途上国における小児の結核診断基準としてよく使用される Kenneth Jones Score はこの研究でも比較的高感度・高特異度を示し、Score 5 以上 (Probable TB or over) で依然有効と考えられた。しかしながら、Score 4 以下でも細菌学的検査が陽性となる例があり、集学的検査が重要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Banu S, Kabir S, Rahman MS, Sharna MS, Dey H, Khatun R, Wagatsuma Y, Mitarai S. Feasibility of using Non-Respiratory Specimens for Diagnosis of Child

Tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis 2013; 17: S125. 44th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, Paris, France. 30 October - 3 November 2013.

Yoshimatsu S, Kato T, Aono A, Chikamatsu K, Yamada H, Mitarai S. Comparison of Centrifugation and Bead-based Method to Isolate *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuber Lung Dis 2013; 17: S222. 44th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Paris, France. 30 October - 3 November 2013.

我妻ゆき子, 馬 恩博, 御手洗聡. バングラデシュにおける小児結核研究. 日本公衆衛生雑誌 2013; 60: 612. 第 72 回日本公衆衛生学会総会 三重 2013 年 10 月 23 日

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 ゆき子 (WAGATSUMA, YUKIKO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40400676

(2) 研究分担者

馬 恩博 (MA, ENBO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 00590770
福島 敬 (FUKUSHIMA, TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 30323299
須磨崎 亮 (SUMAZAKI, RYO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40163050
岡田 昌史 (OKADA, MASAFUMI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 70375492

(3) 研究協力者

御手洗 聡, 結核予防会 結核研究所
Sayera Banu, icddr, b, バングラデシュ