

厚生科学研究研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子
機構および多剤耐性結核の治療に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 阿部千代治

平成 13 (2001) 年 4 月

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子機構および多剤耐性結核の治療に関する研究（H10-新興-4）

研究者名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	阿部千代治	結核予防会結核研究所	部 長
分担研究者	小野寄菊夫	名古屋市立大学薬学部	教 授
	鈴木定彦	大阪府立公衆衛生研究所	主任研究員
	高橋光良	結核予防会結核研究所	科 長
	谷口初美	産業医科大学医学部	教 授
	螺良英郎	結核予防会大阪府支部大阪病院	院 長
	中島由槻	結核予防会複十字病院	副院長
	水口康雄	千葉県衛生研究所	所 長
	毛利昌史	国立療養所東京病院	院 長
	安岡彰	国立国際医療センター	医 長
	和田雅子	結核予防会結核研究所	部 長

目次

I. 総括研究報告書-----	1
阿部千代治（結核予防会結核研究所）	
II. 分担研究報告書	
1. 薬剤耐性結核のサーベイランス、各施設と結研の成績の比較-----	7
2.	
阿部千代治，平野和重，和田雅子（結核予防会結核研究所）	
青柳昭雄（国立療養所東埼玉病院）	
3. 結核菌の臨床分離株を用いたRFLP分析に関する研究-----	21
水口康雄，岸田一則（千葉県衛生研究所）	
4. 分子疫学による薬剤耐性結核菌の解析-----	30
高橋光良，平野和重，和田雅子，阿部千代治	
（結核予防会結核研究所）	
5. 結核菌のカナマイシン耐性の分子遺伝学的解析-----	41
谷口初美，小川みどり，野本まり（産業医科大学医学部）	
6. ピラジナミド耐性結核菌の迅速鑑別法の開発： 分子生物学的手法による迅速ピラジナミダーゼ試験-----	46
鈴木定彦（大阪府立公衆衛生研究所）	
6. 抗酸菌 virulence の <i>in vitro</i> における評価に関する研究-----	61
小野崙菊夫，瀧井猛将，田村綾子（名古屋市立大学薬学部）	
P.J.Brennan（コロラド州立大学）	
阿部千代治（結核予防会結核研究所）	
7. 多剤耐性結核における長期生存例に関する研究-----	68
毛利昌史（国立療養所東京病院）	
佐藤紘二（国立療養所熊本南病院）	

8. 難治性抗酸菌症に対するBIOTHERAPY	
ーロムルチドおよび補中益気湯による免疫増強療法ー続報ー-----	80
螺良英郎 (結核予防会大阪府支部大阪病院)	
9. アンサー20による多剤耐性結核に対する免疫療法に関する研究-----	92
和田雅子 (結核予防会結核研究所)	
桑原克弘 (国立療養所西新潟中央病院)	
千布 節 (国立療養所東佐賀病院)	
河原 伸, 多賀敦彦, 堀場昌英 (国立療養所南岡山病院)	
桜井稔康 (西神戸医療センター)	
河田兼光 (国立療養所南横浜病院)	
守 純一 (結核予防会新山手病院)	
佐藤敦彦 (国立療養所南京都病院)	
溝口國弘 (結核予防会複十字病院)	
10. 多剤耐性結核の集学的治療体制の確立に関する研究-----	101
中島由槻 (結核予防会複十字病院)	
11. HIV感染症に合併する抗酸菌の現状・	
耐性状況と抗ウイルス療法による影響-----	151
安岡 彰 (国立国際医療センター)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	159
IV. 研究成果の刊行物-----	173

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（総括）研究報告書

薬剤耐性結核のサーベイランス，耐性の分子機構および
多剤耐性結核の治療に関する研究

主任研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所基礎研究部長

研究要旨：全国的レベルで薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。5年前の調査と比べ耐性頻度が上昇していること，既治療例の耐性頻度は世界の中央値と比べても明らかに高いことは昨年報告した。今年も，各施設で行なわれた薬剤感受性試験の成績を結研の成績と比較した。各施設では種々の方法で薬剤感受性試験を行っており，結研との一致率をみたとき施設間に差がみられた。特にマイクロタイター法で試験した施設の一致率が低かった。またいずれの試験法を用いた場合も低い一致率を示した施設がみられたことは適切な精度管理が必要であることを示している。IS6110を用いた RFLP 分析は結核の感染様式を解析する上で有効である。RFLP パターンをコンピューターに入力し解析することにより，患者管理を迅速かつ適切に行うことができる。また薬剤耐性のパターンや疫学的調査を組み合わせた一連の研究から薬剤耐性菌による感染が頻発していることが明らかになった。カナマイシン(KM)耐性の分子機構を調べた。16S rRNA の A サイトに変異のみられない KM 耐性株は高頻度に putative efflux pump をコードする *tap* 遺伝子に変異がみられる。しかし感受性株でも変異のみられる株があることより，大腸菌にクローニングし確認を進めている。ピラジナミド(PZA)耐性菌にピラジナミダーゼ活性の消失がみられることに着目し，PCR を基盤とした試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定系を構築した。この系で試験した PZA 耐性 40 株のうち 39 株は低い活性であった。結核菌の病原性を試験するインビトロモデルを開発した。このモデルを用いた試験で，多剤耐性菌(MDR-TB)を含む薬剤耐性菌は感受性菌と同等の病原性を持つことが分かった。これに対し，*Mycobacterium bovis* BCG および *Mycobacterium avium* complex は結核菌と比べ明らかに弱いことが分かった。マレーシアで分離された結核菌は本邦分離株と同等であった。MDR-TB 患者の免疫状態を調べた。血清中の IFN- γ 値は軽快中の患者と比べ低く，TGF- β 値は逆に高かった。このことは MDR-TB 患者では防御免疫が低下していることを示唆している。免疫刺激効果が認められているロムルチド，補中益気湯またはアンサー 20 注と抗結核薬との併用療法を試みた。ロムルチドまたはアンサー 20 注は MDR-TB に対して有用である可能性を示した。今後，投与量および投与期間の検討が必要である。これらの研究を実施するに当たり倫理面に十分配慮した。MDR-TB 患者および感染性肺結核患者の隔離期間について研究した。複十字病院では陰圧の病室を含む嚴重な隔離病棟に改修したのに伴い，この病棟から比較的ゆるい病棟へ転出する場合の運営方針を作成した。MGIT 培地を導入することにより，抗結核薬感受性の患者では早期の

隔離緩和が可能であることが明らかになった。HIV の治療法の改善に伴い、合併する *M. avium complex* 症が減少していることが分かった。一方結核は横這い状態であった。結核症では外国人と肺外結核の割合が高かった。

分担研究者

小野寄菊夫（名古屋市立大学薬学部・教授）、鈴木定彦（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）、高橋光良（結核予防会結核研究所・科長）、谷口初美（産業医科大学医学部・教授）、螺良英郎（結核予防会大阪府支部大阪病院・院長）、中島由槻（結核予防会複十字病院・副院長）、水口康雄（千葉県衛生研究所・所長）、毛利昌史（国立療養所東京病院・院長）、安岡 彰（国立国際医療センター・医長）、和田雅子（結核予防会結核研究所・部長）

A. 研究目的

米国初めヨーロッパ諸国でエイズ患者の間で多剤耐性結核菌による集団感染が多発している。これらは主要な抗結核薬すべてに耐性を獲得している結核菌による感染であり、死亡率は高くしかも診断から死亡までのメジアンも4週間と極端に短くなっている。このことは迅速な診断と感受性試験が重要であることを示している。わが国においてもここ数年の間に多剤耐性結核菌による職場内や病院内の集団感染も報告されており、迅速な臨床細菌検査と検査結果に基づいた適切な患者管理が求められている。

わが国では結核菌の検査を卵培地で行っているため検体採取後感受性試験の結果が得られるまでに8週間を要している。そのため検査の結果が臨床に十分生かされていないのが現状である。この研究の目的は、薬剤に対する耐性の分子機構を

解明することにより耐性の早期検出の道を開き、その結果適切な治療と耐性菌発生の防止を可能にすることである。また耐性菌の病原性の確認、耐性菌のサーベイランスおよび薬剤耐性患者の効果的な治療は耐性菌のさらなる伝播の防止に役立つと考える。

若年者の95%は結核菌未感染者であり、感染の危険が高い。薬剤耐性患者は常に排菌していることから、耐性菌のリザーバーを少なくする意味でも免疫賦活剤と抗結核薬の併用療法および排菌源となっている病巣の外科的処置は、これら若年者への耐性菌感染を防止する上で特に意義がある。この研究の成果は臨床への還元はもとより、国の結核対策に生かされよう。

B. 研究方法

全国的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを行った。全国78の病院に一定期間の間に入院した結核患者で菌が分離された例を対象とした。耐性菌感染の状況を調べるために、上記の研究で集められた菌、千葉県で集められた菌、集団感染あるいは小規模感染例から分離された結核菌について薬剤感受性試験とRFLP分析を行った。

KM 耐性の分子機構を調べることを目的とし、これまでに明らかにされている遺伝子の変異、大腸菌などで知られている耐性遺伝子について調べた。

結核菌感染細胞にサイトカインを添加

したときにみられる細胞死の機構を調べるために、ヒト線維芽細胞株を用い薬剤感受性結核菌、薬剤耐性菌、マレーシアで分離された結核菌、*M. avium complex*の間で細胞死の誘導活性の強さを比較した。

多剤耐性患者に免疫の低下がみられる。結核の防御免疫に関与するサイトカイン発現のレベルを調べた。

現在 MDR-TB に対する有効な治療法はない。免疫細胞刺激効果が確認されているロムルチド（ムラミルジペプチド誘導体）、補中益気湯またはアンサー 20 注と抗結核薬の併用療法を試みた。効果判定は患者の経過観察、細菌学的検査、生化学的検査、画像診断を定期的に行い、非投与群と比較した。副作用、副現象についても記録した。嚴重な隔離病棟の効果的な運営のために、治療経過と排菌状態および画像の変化について研究した。

C. 研究結果と考察

1. わが国の薬剤感受性試験の精度

全国 78 施設と結研の薬剤感受性試験の成績を比較した。各施設では固定濃度法、結研では試験管を用いる比率法を試験に用いた。薬剤別にみたとき、INH の高濃度、RFP、SM に対する感受性試験は 90% 以上の一致率であったが、INH の低濃度と EMB の一致率は低かった。また試験法別にみたとき、マイクロタイターを用いた施設と結研の一致率が低かった。これは高い過大評価率（感受性菌を耐性と判定する）と関連していた。いずれの方法を用いた場合でも、90% 以下の低い一致率を示した施設がみられた。

さらに試験菌株数が少ない施設の一致率が低い傾向にあった。これらのことは、結核菌検査の精度管理が重要であること、特に薬剤感受性試験の精度が問題であることを示している。

2. 薬剤耐性の分子機構

分子遺伝学的手法の導入により、結核菌の薬剤耐性の分子機構が少しずつ明らかになってきた。これまでに、RFP、INH、SM、PZA 耐性の分子機構について報告した。今年 KM 耐性の分子機構を調べた。16S rRNA 遺伝子の A 部位に変異がみられない KM 耐性菌の約 90% は、putative multidrug resistant efflux pump protein をコードしている *tap* 遺伝子に変異を有していた。また 25% は 23S rRNA に変異がみられた。しかし、5S rRNA には変異がみられなかった。薬剤感受性株の中に *tap* 遺伝子に変異を示す株がみられることから、遺伝子を大腸菌にクローニングし、耐性発現との関与について研究を進めている。

薬剤耐性菌の迅速検出のために、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異の検索を試みた。RFP 耐性に関与する *rpoB* 遺伝子の変異を迅速に検出できる DNA チップ法を開発した。検査材料を得てから約 5 時間で RFP 耐性菌の約 95% を同定できることが分かった。PZA 耐性菌ではピラジナミダーゼ活性の消失がみられる。このことは、耐性菌の 95% はピラジナミダーゼをコードしている *pncA* 遺伝子に変異がみられることから証明されている。PCR を基盤とした試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定

系を構築した。この系で試験した PZA 耐性 40 株の内 39 は標準株である結核菌 H37Rv 株と比べ低い活性であった。このことは PZA 耐性結核菌を迅速に検出することが可能であることを示している。

3.耐性菌の病原性と感染

ヒト線維芽細胞に結核菌を感染させると細胞死が起こる。この系にサイトカインを加えると細胞傷害が増強される。細胞死は死菌添加では起こらないこと、実験動物に対する病原性が異なる結核菌 H37Rv と H37Ra を比べたとき、病原性の強い H37Rv がより強い細胞死を誘導することを見出した。このモデルで MDR-TB は薬剤感受性菌と同等の細胞傷害活性(病原性)を持つことが分かった。これに対し、*M. bovis* BCG と *M. avium* complex は結核菌に比べて明らかに病原性が弱いことが分かった。またマレーシアで分離された結核菌は本邦で分離された結核菌と同等の病原性を示すことも明らかになった。

結核菌の挿入配列を用いた RFLP 分析により結核菌の亜分類が可能となった。千葉県下で発生した多剤耐性菌による集団感染を 2 件 RFLP 分析で証明した。集団感染例について、MIC の測定と耐性に関与する遺伝子の解析を組み合わせることにより、感染のより詳しい解析が可能である。

RFLP 分析とコンピューター患者管理システムを用いることにより患者情報と結核菌のタイピングを迅速に比較することが可能となった。全国から集めた結核菌をこのシステムで解析したところ、薬

剤耐性菌による伝播を 13 クラスター確認できた。この手法は感染源追跡に有力な手段である。

4.多剤耐性結核の治療

多剤耐性患者の中には急激な悪化を来すこともなく長年持続排菌を続けている患者がいる。治癒した患者とこのような MDR-TB 患者の間に差があるかどうか調べた。MDR-TB 患者では、治癒傾向に向かっている患者やほぼ治癒した患者と比べ血清中の IFN- γ 値は有意に低く、TGF- β 値は高いことが分かった。これは結核菌に対する応答に差があることを示している。一方 Th1 と Th2 比に有意さは認められなかった。このことから、MDR-TB 患者では TH1 細胞の機能減弱が推測される。

MDR-TB の治療に *M. vaccae* 死菌と抗結核薬の併用療法あるいは IL-2 や IFN- γ 投与の成績が報告されている。しかしこれらはまだ確立された方法ではない。免疫刺激効果が確認されているロムルチド、補中益気湯あるいはアンサー 20 注と抗結核薬との併用治療を試みた。ロムルチドを投与した *M. avium* complex 症 2 名中 1 名と MDR-TB 1 名では体重の増加、排菌数の減少、胸部 X 線所見の安定が認められた。補中益気湯投与患者の一部に改善の見られた例があった。

少なくとも 6 ヶ月排菌が停止しない MDR-TB 患者にアンサー 20 注と抗結核薬の併用療法を試み、その効果をプラセボと比較した。アンサー 20 注投与を受けた 13 例中 3 例は有効、1 例はやや有効、6 例は無効、脱落除外は 3 例であっ

た。これに対し、プラセボ群では有効例は認められず、やや有効が3例、無効が6例、脱落が3例であった。数種類の有効薬剤が残っており、病巣が比較的新しく、高齢でなく、呼吸不全を合併していない例に成功例が認められた。6ヵ月よりも長期間使用すると効果がみられる症例があると思われたことから、今後投与量や投与期間の検討が必要である。

MDR-TB 患者および感染性患者の隔離期間について研究した。複十字病院では、1病棟を嚴重な隔離病棟（病棟全体を陰圧）に改修したのに伴い、この病棟から比較的ゆるい病棟へ転出する場合の運営方針を作成した。主要4剤に感受性の患者については INH+RFP+PZA+SM/EMB の強化化学療法開始後、2～3週経過した時点でゆるい隔離病棟に転出させる方針とした。改修後の嚴重隔離病棟に入院した患者の転出時あるいは転出後の状況を調べたところ、転出時には85%、転出後1ヵ月以内で96%の患者で感染性が消失していた。この結果は、MGIT 培地を導入することで主要薬剤にすべて感受性の患者について、早期の隔離緩和が可能であることを示しており、患者の人権確保とストレスの解消、入院期間の短縮に寄与するものと考えられる。

HIV 感染者にみられる抗酸菌感染症について調べた。757名の患者に結核が34例(4.5%)、非結核性抗酸菌症21例(2.8%)が認められた。非結核性抗酸菌症は強力なHIV療法により減少傾向にあったが、結核は横這いであった。耐性菌感染例はみられなかったが抗結核剤によるアレルギーや副作用による治療中止例が高頻度

にみられた(38.2%)。非結核性抗酸菌症では、播種性病変が66.7%と最も多かったが、肺病変を呈した例も23.8%認められた。末梢血CD4値が530/ μ lで発生した *M. intracellulare* によるカリエス症例も認められ、抗HIV療法の変化により、非結核性抗酸菌症の病態にも変化がみられている可能性がある。

D. 結論

- 1.各施設の薬剤感受性試験の成績を結研と比較した。マイクロタイター法を用いた施設の一致率が低かった。また試験法の如何を問わず一致率の低い施設がみられたことは精度管理研究の必要性を示唆している。
- 2.putative efflux pump をコードする *tap* 遺伝子の変異と KM 耐性発現との関連について研究した。
- 3.PZA 耐性菌にピラジナミダーゼ活性の消失がみられることに着目し、PCR を基盤とした試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定法を開発した。
- 4.RFLP パターンをコンピューターに入力し解析することにより、患者管理を迅速かつ適切に行うことが可能になった。また薬剤耐性や疫学的調査を組み合わせた一連の研究から耐性菌感染が頻発していることが明らかになった。
- 5.結核菌の病原性を試験するインビトロモデルを開発した。MDR-TB は感受性菌と同等の病原性を持つことが明らかになった。
- 6.MDR-TB 患者では軽快中の患者と比べ Th1 細胞の機能減弱が推測された。

7.MDR-TB 患者で、ロムルチド、補中益気湯あるいはアンサー 20 注と抗結核薬との併用治療を試みた。免疫刺激剤と抗結核薬との併用治療群に有効例が認められた。今後投与量や投与期間の検討が必要である。

8.MDR-TB 患者および感染性肺結核患者の隔離について研究した。MGIT 培地を導入することにより、全剤感受性例では早期に嚴重隔離病棟から比較的緩い隔離病棟への転出が可能である。

9.HIV 感染者にみられる抗酸菌症について調べた。強力な HIV 療法により非結核性抗酸菌症は減少したが結核は横這い状態であった。

E.研究発表
別紙

F.知的所有権の取得状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

薬剤耐性結核のサーベイランス、各施設と結研の成績の比較

分担研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所基礎研究部長
研究協力者 平野 和重 結核予防会結核研究所
和田 雅子 結核予防会結核研究所
青柳 昭雄 国立療養所東埼玉病院

研究要旨：全国 78 施設が参加した薬剤耐性結核の調査を行った。1997 年 6 月 1 日から同年 11 月 30 日の間に病院に入院した患者から分離された抗酸菌が結核予防会結核研究所（以下結研）に送付された。結研では送付された結核菌の同定と薬剤感受性試験を行った。合計で 2,167 例の培養が結研に送られた。そのうち 523 例は種々の理由で調査から除外された。その内訳は、453 は非結核性抗酸菌、16 は結核菌と非結核性抗酸菌の混合培養、54 は汚染または発育不能であった。結果として 1,644 培養が薬剤感受性試験に供された。その中に外国人が 47 例含まれていた。各施設では 1%小川培地を用いる固定濃度法（普通法、26 施設）、マイクロタイター法（29 施設）、ウエルバック法（7 施設）、上記 2 種または 3 種の組み合わせ（13 施設）、その他（3 施設）で薬剤感受性試験を行った。結研では 1%小川培地を用いる比率法を用いた。各施設の成績と結研の結果が比較された。薬剤別に見たとき、イソニアジド (INH) の高濃度（1 μ g/ml）、リファンピシン (RFP) およびストレプトマイシン (SM) に対する感受性試験は 90% 以上の高い一致率であったが INH の低濃度とエタンプトール (EMB) の一致率は 90% 以下であった。しかし、各施設で用いた試験法の間で薬剤別に見たとき一致率に有意の差は認められなかった。各施設の普通法、マイクロタイター法、ウエルバック法と結研の成績の一致率（中央値）はそれぞれ 95.9%、93.2%、96.4% であった。マイクロタイター法を用いた施設で見られた低い一致率と過大評価率が逆相関していた。即ち各施設で普通法あるいはウエルバック法を用いた施設の過大評価率が 1.2% と 2.3% であったのに対し、マイクロタイター法では 5.3% であった。しかし、いずれの方法を用いた場合も 90% 以下の低い一致率を示した施設が見られた。このことは施設により試験の精度にばらつきがあることを示しており、精度管理の必要性を示唆している。

A. 研究目的

世界保健機関 (WHO) は国際結核肺疾患予防連合 (IUATLD) と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べることを目的としたプロジェクトを 1994 年に開始した。これまでに、調査に参加した国

のすべてに薬剤耐性菌が出現していること、少なくともイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を示す多剤耐性結核 (MDR-TB) の頻度が高い地域があり結核対策を困難にしていることが明らかになった。

結核菌の細菌学的検査の中で最も精度管理の難しい検査は薬剤感受性試験である。わが国では複数の方法が取り入れられており、施設によりその方法が異なる。今回の共同研究では、各施設で従来からの絶対濃度法で試験した菌を結核予防会結核研究所（以下結研と記載する）に集め、日本結核病学会から提案された比率法で再検査した。ここでは各施設で得られた成績と結研の成績の比較について述べる。

B.材料と方法

1.調査対象

結核病床を持つ病院の中で 78 施設がこの共同研究に参加した。1997 年 6 月 1 日から同年 11 月 30 日までの間に入院した結核患者および非結核性抗酸菌症患者で菌が分離された例を対象にした。各施設において、感受性試験が終了した時点で調査個人票を作成した。分離培養または感受性試験の対照培地のいずれかの菌株を郵便法に定められたように缶またはプラスチックの容器に入れ、調査個人票と一緒に結研に送付した。結研では汚染のチェックと増菌培養の目的で到着後直ちにミドルブルック 7H9 液体培地で培養した。その全培養を凍結用チューブに移し、使用時まで -30°C に保存した。

2.分離菌の同定

分離菌の同定は施設により異なる方法で行われていた。結研では、アキュプローブ法(極東製薬)および抗 MPB64 モノクローナル抗体を用いる免疫クロ

マトグラフィー(MPB64-ICA)で送付された菌を鑑別した。結核菌以外の非結核性抗酸菌の鑑別・同定には DDH マイコバクテリア(極東製薬)および培養・生化学的試験を用いた。

3.薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の方法も施設により異なっていた。結研では、日本結核病学会から新しく提案された小川培地を用いる比率法を試験に用いた。試験は主要 4 薬剤, INH, RFP, ストレプトマイシン(SM), エタンプトール(EMB)について行った。薬剤含有培地は結研で作り、作製後 2 週以内に試験に供した。接種菌はミドルブルック 7H9 液体培地で培養した。McFarland No.0.5 に調製し、その 100 倍希釈液の 0.1ml を薬剤含有培地に接種した。対照培地は 2 本用意し、100 倍希釈液と 10,000 倍希釈液を接種し、 37°C で培養した。10,000 倍希釈液を接種した対照培地のコロニー数と比較して、薬剤含有培地のコロニー数が多ければ耐性菌の割合が 1%以上と判定し、耐性と記録した。

4.集計および解析

成績の一致率, 過大評価率, 過小評価率は検査評価例数に対する一致例数, 過大評価例数(各施設では耐性と判定していたが結研では感受性と判定した例数), 過小評価例数(各施設では感受性と判定していたが結研では耐性と判定した例数)の割合として表した。統計学的有意差の検定は χ^2 試験により行った。

C.結果

結核病床を持つ病院のなかで 78 施設が今回の共同研究に参加した。1997 年 6 月 1 日から同年 11 月 30 日までの間にそれぞれの病院で入院患者から分離された抗酸菌 2,167 例の個人票と抗酸菌が結研に送られた。

表 1 に示したように参加 78 施設の中で 49 施設(62.8%)は鑑別・同定検査にナイアシン試験を用いていた。次いで DDH マイコバクテリアが 44 施設(56.4%)、アキュプローブ法が 27 施設(34.6%)、核酸増幅法が 25 施設(32.1%)で用いられていた。これらの試験法を単独で用いている施設は少なく、多くの施設は 2 つ以上の方法を組み合わせて鑑別・同定していた。

結研では送付された菌株の鑑別・同定をアキュプローブ法、MPB64-ICA、DDH マイコバクテリアおよび従来からの培養・生化学的方法で行った。送付された 2,167 例のうち 523 例は、非結核性抗酸菌(453 例)、結核菌と非結核性抗酸菌の混合(16 例)、培地の汚染と発育不能(54 例)のため除外し、残る 1,644 例を分析した。在日外国人の結核患者の増加が指摘されているが、今回調査した 1,644 例の中で外国人は 47 例(2.9%)であった。1,374 例は初回治療例であり、264 例は 2 週間以上の治療歴を持つ既治療例であった。初回治療例であっても、外来で 2 週間以上治療後に入院治療に切り替えた例は既治療例に含めた。

各施設から報告された成績と結研の鑑別・同定試験の間に不一致例がいく

つかみられた(表 2)。各施設から結核菌群として報告された菌株のうち 32 株は結研での試験で非結核性抗酸菌と同定された。また結核菌群と報告された 16 培養は結核菌群と非結核性抗酸菌の混合培養であった。

用いた薬剤感受性試験の方法は施設により異なっていた(表 3)。26 施設は小川斜面培地を用いる普通法、29 施設はマイクロタイター法、7 施設はウエルパック法を用いて試験した。また 13 施設は上記 3 種の組み合わせ、3 施設は MIC 測定などを薬剤感受性試験に用いた。

今回の研究では、各施設は絶対濃度法、結研は比率法で試験したことから厳密に比較することはできない。しかし試験法は異なるが、各施設で普通法で試験した施設の 83%は結研の成績と 95%以上の高い一致率を示したことから比較することは意味があると考えた。

ここでは INH については各施設の 0.1 μ g/ml と結研の 0.2 μ g/ml, RFP は各施設の 50 μ g/ml と結研の 40 μ g/ml, SM は各施設の 20 μ g/ml と結研の 10 μ g/ml, EMB は各施設の 2.5 μ g/ml と結研の 2.5 μ g/ml の成績を比較した。各施設の成績と結研の成績の試験薬剤別一致率、過大評価率、過小評価率を表 4-1(各施設の普通法)、表 4-2(各施設のマイクロタイター法)および表 4-3(各施設のウエルパック法)に示した。INH の試験濃度 1 μ g/ml, RFP および SM についてはいずれの試験法でも 90%以上の高い一致率であったが、INH の試験濃度 0.1 μ g/ml(結研

の 0.2 μ g/ml との比較)と EMB について結研の成績との一致率は 90%以下であった。後者の低い一致率は過大評価率の高さと関連していた。即ち結研の成績では感受性と判定されていた例が各施設では耐性と判定されていた。

今回 10 株以上試験した施設について、施設別一致率、過大評価率、過小評価率を表 5-1 (普通法)、表 5-2 (マイクロタイター法)、表 5-3 (ウエルパック法) に示した。各施設の普通法と結研の一致率は 75.0%から 100%の間であり、その中央値は 95.9%であった。普通法で試験した 18 施設のうち 15 施設 (83.3%) は 95%以上の高い一致率であった。各施設のマイクロタイター法と結研の一致率は 37.5%から 99.4%の範囲であり、その中央値は 93.2%であった。22 施設のうち 7 施設 (31.8%) は 90%未満の低い一致率であった。これは高い過大評価率と関連しており、5 施設は 10%以上の過大評価率であった。ウエルパック法で 10 株以上を試験した施設数は 5 施設であり、一致率は 75%から 97.8%の範囲であった。一致率別に比較した成績を表 6 に示した。90%以上の一致率を示した施設は、普通法で 83.3%、マイクロタイター法で 68.2%、ウエルパック法で 80%であり、用いた方法により一致率に差がみられた。しかしいずれの方法でも一致率 80%以下の施設がみられた。成績は示さなかったが試験株数が 10 以下の施設の一致率がより低い傾向にあった。

各施設で耐性と判定した分離株で結研でも耐性と判定した株の割合は 50%

以下であったが、結研で耐性と判定した株のほぼ 80%は各施設でも耐性と判定していた (表 7)。これに対し、各施設で感受性と判定していた株の 99%は結研でも感受性と判定していた。

D. 考察

結核菌群に属する菌種と *Mycobacterium kansasii* を除く他の抗酸菌は抗結核薬に感受性が低く、結核菌の感受性試験に用いている濃度では多くの非結核性抗酸菌は耐性と判定される。今回の調査で初回治療例の耐性の頻度は 10.3%であり、非結核性抗酸菌の混入は薬剤耐性結核の頻度を大きく変えるに違いない。それゆえ薬剤耐性結核の調査において、分離された菌の鑑別は非常に重要である。

わが国では分離結核菌の鑑別にナイアシン試験、PNB 培地上の発育試験、アキュプローブ結核菌群鑑別試験、DDH マイコバクテリア、培養・生化学的試験が用いられている。新結核菌検査指針では、核酸の相同性を利用したキットの使用を勧めている。即ちアキュプローブキットの感度と特異性は 100%であることから、先ずこのキットで鑑別し陰性例については DDH マイコバクテリアと培養・生化学的試験により同定する。この場合も発育日数やコロニーの形態および着色などを参考にするのはもちろんである。今回の共同研究参加 78 施設の中で 13 施設 (16.7%) は単独の試験で結核菌群を鑑別していた。2 施設はナイアシン試験のみ、11 施設は核酸を用いた試験を

用いていた。*M. africanum*, BCG のある株 (BCG 日本株), *M. ulcerans* や *M. simiae* はナイアシン試験陽性であり, *M. chelonae*, *M. avium*, *M. kansasii* などでナイアシン試験陽性の菌株も 1~2%存在する。それゆえ, 結核菌の鑑別をナイアシン試験単独で行った場合に誤って鑑別されることがある。参加施設の中に PNB 培地上の発育試験を単独で用いていた施設はなかった。大部分の施設 (65/78, 83.3%) は上記試験を 2 種以上組み合わせて結核菌の鑑別を行っていた。

各施設の鑑別の結果と結研の成績の間に不一致例が 48 例みられた (Table 2)。それぞれの施設で結核菌群と同定された 32 株 (32 / 1,644, 1.9%) は結研で行った試験で非結核性抗酸菌と鑑別された。また各施設で結核菌群と鑑別された培養の 16 (16 / 1,644, 1%) は結研の試験で結核菌群と非結核性抗酸菌の混合培養であった。ここ 1~2 年の間に初回分離に液体培地が用いられるようになった。しかし液体培地のみの培養では, 結核菌の培養に約 1%存在する非結核性抗酸菌の混入を見落すことがあり, 結核菌の薬剤感受性を誤って判定することがある。初回の分離培養に液体培地と卵培地を 1 本ずつ用いることが重要であり, 新検査指針でも勧めている。

結核菌の細菌学的検査の中で精度管理の最も難しい検査は薬剤感受性試験である。国により感受性試験の方法や用いる培地の種類が異なり, そこで得られた成績は異なることが予想される。

わが国では, 大部分の検査室は 1%小川培地を用いる絶対濃度法を使用しており, 実際には斜面培地を用いる普通法, 簡便法であるマイクロタイター法とウエルパック法で試験している。今回, 共同研究参加 78 施設の中で 26 施設は普通法 (33.3%), 29 施設 (37.2%) はマイクロタイター法, 7 施設 (9%) はウエルパック法, 13 施設 (16.7%) は 2 種または 3 種の組み合わせで試験した。結研では日本結核病学会から提案された 1%小川斜面培地を用いる比率法で試験した。各施設と結研では用いた試験法と試験濃度が異なることから厳密に比較することはできない。しかし表 6 に示したように普通法で試験した 18 施設のうち 15 施設 (83.3%) は結研の成績と 95%以上の一致率であった。この結果は, 各施設の成績を薬剤別, 試験法別に結研の成績と比較することは薬剤感受性試験の精度管理の上で意味があることを示している。

INH の低濃度と EMB の一致率が 90%以下であり, いずれの試験法でも同じ傾向であった。治療前の患者から分離された結核菌の INH に対する MIC は広く分布していることが知られている。この研究では, 各施設の 0.1 $\mu\text{g/ml}$ と結研の 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の成績が比較されたことから, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性 / 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 感受性の菌株が含まれていることが考えられる。しかし EMB の試験は同じ試験濃度が用いられており, 低い一致率の理由は不明である。前回の調査 (1992 年) でもマイクロタイター法を用いた施設と結研の成績の間で同様の

傾向を認めた。今後新しい検査法に変わることから早急に検討する必要がある。

試験菌株数が 10 以上の施設の一致率を表 5-1, 表 5-2, 表 5-3 に示した。マイクロタイター法で試験した施設の結研の成績との一致率は 37.5% から 99.4% の範囲であり, 7 施設 (31.8%) は 90% 未満の低い一致率であった。これは過大評価率の高さと関連していた。マイクロタイター法では普通法と比べ培地量が少ないにもかかわらず接種菌量が多いため, 判定最適日を越えてから成績の判定をした場合に薬剤の種類により感受性菌を耐性と読む傾向がある。一方普通法およびウエルパック法で試験した施設の一致率の中央値は 96% であり, 過大評価率の中央値も低いレベルであった。しかしいずれの方法を用いた場合も 90% 以下の低い一致率を示した施設が見られた。

試験菌株数が 10 以下の施設の成績は示さなかったが 10 以上の施設より一致率が低い傾向にあった。培地製造後使用までの保存期間の長さも結果に大きく影響することが知られており, 薬剤含有培地は製造後 1 ヶ月以内に使用することが勧められている。ここでみられた試験菌株数が少なかった施設の一致率がより低かった理由については分からない。しかし一部は製造後の保存期間の長さと関係していることが考えられる。

各施設で行なわれた普通法, マイクロタイター法, ウエルパック法で耐性と判定した菌株の中で 51.4%, 61.6%,

69.4% は結研での試験で感受性と判定された (表 7)。これに対し感受性と判定した菌株は結研の試験でもほぼ 100% 感受性であった。これらのことは感受性試験の結果を治療に応用する上で十分注意する必要があることを示唆している。特に INH と EMB の低濃度については考慮する必要がある。いずれにしても使用する培地および操作法の精度管理のために, 検査室で標準菌株を用い定期的にチェックすることが大事である。

現在液体培地を用いる薬剤感受性試験法が評価されている。米国の NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) も液体培地または寒天培地での感受性試験を勧めている。保険点数との関連で今後クリアしなければならぬ問題も残っているが, 検査の精度と迅速性を考慮し液体培地の導入を検討する必要があるだろう。

E. 結論

(1) 78 の結核専門病院が参加した全国規模の薬剤耐性結核の調査を行った。各施設から報告された薬剤感受性試験の報告と結研の成績が比較された。

(2) 薬剤別に見たとき, INH の高濃度, RFP, SM に対する感受性試験は 90% 以上の一致率であったが, INH の低濃度と EMB の一致率は低かった。

(3) 試験法別に見たとき, マイクロタイター法を用いた施設と結研の一致率が低かった。これは高い過大評価率と関連していた。

(4)いずれの方法を用いた場合でも、90%以下の低い一致率を示した施設が見られたことは、精度管理の必要性を示唆している。

F.研究発表

1.論文発表

- 1) Abe C, Hirano K, Wada M, Aoyagi T : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001 ; 5 : 1-7.
- 2) Takii T, Abe C, Tamura A, Ramayah S, Belisle JT, Brennan PJ, Onozaki K : Interleukin 1 or tumor necrosis factor α augmented cytotoxic effect of mycobacteria on human fibroblasts : application to evaluation of pathogenesis of clinical isolates of *M. tuberculosis* and *M. avium* complex. *J Interferon Cytokine Res* 2001 (in press).
- 3) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 平賀 通, 高嶋哲也, 末竹寿紀 : Line Probe Assay (LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核* 2000 ; 75 : 575-581.
- 4) 平野和重, 和田雅子, 阿部千代治, 青柳昭雄, 療研共同研究参加 78 施設 : 入院時薬剤耐性に関する研究 : 1997 年度の各施設と結研の成績の比較. *結核* 2001 (in press).
- 5) 阿部千代治 : 結核菌検査の進歩と実際. *臨床と研究* 2000 ; 77 : 701-704.
- 6) 吉田菊喜, 吉原明子, 国香大介, 戸塚浩平, 有田富和, 白石廣行, 高橋

光良, 阿部千代治 : 結核検診における接触者検診の意義 : 接触者検診で発見された4例の結核発病者の検討より. *加齢医学研究所誌* 2000 ; 51 : 67-77.

- 7) 阿部千代治 : 新結核菌検査指針について. *モダンメディア* 2000 ; 46 : 283-288.
- 8) 阿部千代治 : 結核の細菌学的診断. *Pharma Media* 2000 ; 18 : 33-38.
- 9) 阿部千代治 : 結核菌について : 最近の細菌学的知見. *Medical Practice* 2000 ; 17 : 951-954.
- 10) 阿部千代治 : 結核の細菌学的検査法. *Bio Clinica* 2001 ; 16 : 113-117.
- 11) 阿部千代治 : 薬剤感受性検査. *臨床と微生物* (in press).
- 12) 阿部千代治 : 薬剤耐性の発現機序と耐性検査. *化学療法の領域* 2001 (in press).

2.学会発表

- 1) Abe C, Hirano K, Tomiyama T : Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay. Meeting of ASM : Tuberculosis 2000, New York, USA, June 20-24, 2000.
- 2) Abe C, Hirano K, Wada M, Aoyagi T : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. 21st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Vienna, Austria, July 2-5, 2000.

- 3) Abe C: The current trends of Mycobacterium research after whole genome analysis of *M. tuberculosis*. International Symposium of the Pusan Genome Center, Pusan, Korea, February 22, 2001.
- 4) Abe C : Anti-tuberculosis drug resistance in Japan . The 21st Eastern Region Conference of IUATLD , Manila , Philippines , March 6-9, 2001.
- 5) 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 青柳昭雄, 療研共同研究参加 78 施設 : 入院時薬剤耐性に関する研究, 1997. 第 75 回日本結核病学会総会, 大阪市, April 18, 19, 2000.
- 6) 野内英樹, 吉山 崇, 下内 昭, 阿部千代治, 石川信克, 森 亨 : タイ北部 HIV 感染蔓延地域における結核疫学状況と対策. 第 75 回日本結核病学会総会, 大阪市, April 18, 19, 2000.
- 7) 高橋光良, 森 亨, 鹿住祐子, 平野和重, 深澤 豊 : RFLP 分析を用いた沖縄県における結核の感染・発病に関する研究. 第 75 回日本結核病学会総会, 大阪市, April 18, 19, 2000.
- 8) 高橋光良, 鹿住祐子, 平野和重, 深澤 豊 , 阿部千代治 : Spoligotyping 法を用いた結核菌の分子疫学の評価. 第 75 回日本結核病学会総会, 大阪市, April 18, 19, 2000.
- 9) 阿部千代治 : 日本における結核菌の薬剤耐性頻度. 第 73 回日本細菌学会総会, 札幌市, May 29-31, 2000.
- 10) 高橋光良, 阿部千代治 : 沖縄県で分離された結核菌を用いた分子疫学. 第 73 回日本細菌学会総会, 札幌市, May 29-31, 2000.
- 11) 阿部千代治 : 薬剤耐性結核の現状と耐性の分子機構. 第 74 回日本細菌学会総会, 岡山市, April 2-4, 2001.
- 12) 高橋光良, 阿部千代治 : 薬剤耐性結核菌の分子疫学と患者管理システムを用いたモニタリングに関する研究. 第 74 回日本細菌学会総会, 岡山市, April 2-4, 2001.
- 13) 阿部千代治 : 日本および世界の薬剤耐性結核の現状.
- 14) 野下秀広, 阿部千代治 : 民間臨床検査センターにおける結核菌群核酸増幅同定検査の精度管理. 第 76 回日本結核病学会総会, 宜野湾市, April 20, 21, 2001.
- 15) 和田雅子, 阿部千代治, 森 亨, 青柳昭雄 : 肺結核症治療・管理コホート分析. 第 76 回日本結核病学会総会, 宜野湾市, April 20, 21, 2001.
- 16) 平野和重, 和田雅子, 阿部千代治, 青柳昭雄, 療研共同研究参加 78 施設 : 入院時薬剤耐性に関する研究 (1997 年療研研究), 各施設と結研の成績の比較. 第 76 回日本結核病学会総会, 宜野湾市, April 20, 21, 2001.
- 17) 深澤 豊, 鹿住祐子, 平野和重, 高橋光良 , 阿部千代治 : *Mycobacterium gordonae* と *Mycobacterium szulgai* の鑑別・同定.