

Table 2 Number of cultures tested in the study

Patient	Male	Female	Total
Tuberculosis	1188	456	1644
NTM	226	227	453
Tuberculosis + NTM	11	5	16
Other*			54
All cases			2167

*Contamination or no growth.

NTM = non-tuberculous mycobacteriosis.

Table 1. Of the 10214 cases, 1644 (16.1%) were admitted to the present study. The rates of the survey targets of this study, which were determined by district, were between 9.2% and 27.5%.

The prevalence of primary resistance to any of the four drugs tested was 10.3% (Tables 3 and 4). The drugs to which organisms were most frequently resistant in new cases were streptomycin (7.5%), isoniazid (4.4%) and rifampin (1.4%). Ethambutol had resistance rates of less than 1%. Drug resistance was much more frequent in retreatment cases than in new cases. The prevalence of acquired drug resistance to any of the four drugs was 42.4%. Resistance to isoniazid, rifampin and streptomycin was observed in over 20% of the cases. There were significant differences in resistance rates to each of the four drugs between new and retreatment cases ($P < 0.0001$).

Of 141 drug-resistant isolates in new cases, 73.0% (103/141) were resistant to one drug, while 64.3% (72/112) of resistant isolates in retreatment cases were resistant to two or more drugs (Table 4). The prevalence of primary and acquired MDR was 0.8% and 19.7%, respectively. There were significant differences in resistance rates to two or more drugs and MDR between new and retreatment cases ($P < 0.0001$).

Drug resistance rates by sex, age, country of origin, and with or without accompanying disease are shown in Table 5. Overall rates of resistance for males and females were essentially equal: 15.7% for males, and 14.9% for females in all cases (shown under

Table 3 Prevalence of drug resistance to each drug

Drug	Primary resistance (<i>n</i> = 1374)		Acquired resistance (<i>n</i> = 264)		Combined resistance* (<i>n</i> = 1644)	
	Single [†]	Any [‡]	Single	Any	Single	Any
Isoniazid	2.0	4.4	6.8	33.0	2.8	9.1
Rifampin	0.2	1.4	0.8	21.6	0.3	4.7
Streptomycin	5.2	7.5	6.4	24.2	5.5	10.3
Ethambutol	0.1	0.4	0	15.2	0.1	2.8

* Six cases with unknown tuberculosis treatment history are included under 'Combined'.

[†] Denotes resistance only to the drug in question.

[‡] Denotes resistance to the drug in question with or without resistance to other drugs.

For primary vs. acquired with respect to resistance to each drug: Any = $P < 0.0001$.

Table 4 Prevalence of resistance to one or more drugs

Resistance to	Primary resistance (<i>n</i> = 1374) <i>n</i> (%)	Acquired resistance (<i>n</i> = 264) <i>n</i> (%)	Combined resistance* (<i>n</i> = 1644) <i>n</i> (%)
One drug	104 (7.6)	40 (15.2)	145 (8.8)
Two drugs	29 (2.1)	27 (10.2)	56 (3.4)
Three drugs	5 (0.4)	27 (10.2)	33 (2.0)
Four drugs	3 (0.2)	18 (6.8)	21 (1.3)
Any drug	141 (10.3)	112 (42.4)	255 (15.5)
Two or more	37 (2.7)	72 (27.3)	110 (6.7)
MDR	11 (0.8)	52 (19.7)	64 (3.9)

* Six cases with unknown tuberculosis treatment history are included under 'Combined'.

For primary vs. acquired with respect to resistance to any drug, two or more drugs and multidrug resistance: $P < 0.0001$.

MDR = multidrug resistance—defined as resistance to at least isoniazid and rifampin.

'combined resistance' in Table 5). No significant differences in resistance rates of both new and re-treatment cases were found in any age group, nor were there any significant differences between Japanese and foreign-born patients, nor among patients with or without an accompanying disease, in the prevalence of resistance to any of the drugs.

The 254 combined resistance cases reported here were from seven different districts (Table 6). Resistance rates were over 10% in six districts—Hokkaido (13.5%), Kanto (13.4%), Tokai-Hokuriku (15.1%), Kinki (20.7%), Chugoku-Shikoku (17.3%) and Kyushu (15.7%)—and around 10% in one district, Tohoku (9.8%). However, there were no significant differences in the rates of resistance by district.

DISCUSSION

The nationwide surveys of drug-resistant tuberculosis in Japan have been carried out by the Tuberculosis Research Committee of Japan (Ryohken) at 2- to 5-year intervals.¹²⁻¹⁶ This is the twelfth survey conducted by the Committee.

A survey must be based on a sample of tuberculosis patients representative of all the cases in the country. A total of 78 facilities in different districts of Japan participated in this cooperative study. The duration of the survey was 6 months, from 1 June to 30 November 1997. All eligible patients in the participating hospitals were included within a given intake period. As all tuberculosis patients with positive smears are hospitalized for treatment in Japan, the survey had a 100% sampling of participating hospitals during the study period.¹¹

As drug susceptibility testing is performed by a number of methods in numerous laboratories, quality control and laboratory proficiency probably vary. In this survey, the collaborating laboratories accordingly sent all mycobacterial isolates, including MOTT bacilli, to the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, which is one of the Supranational Reference Laboratories of the

Table 5 Resistance to one or more drugs in culture-positive tuberculosis cases by sex, age, nationality, and with or without accompanying disease

Variables	Primary resistance			Acquired resistance			Combined resistance*		
	Tested <i>n</i>	Resistant <i>n</i>	(%)	Tested <i>n</i>	Resistant <i>n</i>	(%)	Tested <i>n</i>	Resistant <i>n</i>	(%)
Sex									
Male	981	104	(10.6)	202	81	(40.1)	1188	187	(15.7)
Female	393	37	(9.4)	62	31	(50.0)	456	68	(14.9)
Age (years)									
≤19	20	3	(15.0)	2	0		22	3	(13.6)
20-29	134	15	(11.2)	13	5	(38.5)	147	20	(13.6)
30-39	130	11	(8.5)	18	9	(50.0)	149	20	(13.4)
40-49	170	24	(14.1)	33	16	(48.5)	203	40	(19.7)
50-59	236	26	(11.0)	47	21	(44.7)	283	47	(16.6)
60-69	226	25	(11.1)	55	29	(52.7)	282	54	(19.1)
70-79	263	22	(8.4)	71	26	(36.6)	337	50	(14.8)
80-89	174	14	(8.0)	24	6	(25.0)	199	20	(10.1)
≥90	21	1	(4.8)	1	0		22	1	(4.5)
Nationality									
Japanese	1337	135	(10.1)	254	105	(41.3)	1597	241	(15.1)
Foreign-born	37	6	(16.2)	10	7	(70.0)	47	13	(27.7)
Accompanying disease									
With	559	65	(11.6)	124	52	(41.9)	686	118	(17.2)
Without	805	73	(9.1)	134	58	(43.3)	942	132	(14.0)

* Includes six cases with unknown tuberculosis treatment history.

There were no significant differences in the prevalence of resistance to anti-tuberculosis drugs by sex, age, nationality, and with or without accompanying disease.

WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance.^{10,11} There, drug susceptibility testing of the isolates was carried out by the proportion method using the Ogawa egg slant, the standard method used in Japan as recommended by the Bacteriology Expert Committee of the Japanese Society for Tuberculosis,¹⁸ in which concentrations comparable to the conventional method^{7,19,20} using L-J medium as critical concentration are used. The results obtained are comparable with those of the WHO/IUATLD Global Project.^{10,11}

The prevalence of primary resistance to any drug and/or any two or more drugs was 10.3% and 2.7%, respectively, and that of primary MDR was 0.8%. These values were almost the same level as the median prevalence reported in the global project.^{10,11} On the other hand, the prevalence of acquired resistance to any drug and/or any two or more other

drugs, and acquired MDR was 42.4%, 27.3%, and 19.7%, respectively. These figures were higher than the median prevalence reported in the Global Project.

Rifampin was first introduced for the treatment of tuberculosis in Japan in 1972; since then it has been included in both the 6-month and 9-month standard regimens throughout treatment. As shown in Table 5, around 50% of new cases were aged 60 years and over, a population in whom the estimated prevalence of tuberculosis infection was over 60% in Japan,²¹ indicating that most cases in these age groups might be the result of reactivation of a tuberculosis infection obtained several decades before, which may partly explain the low MDR levels in new cases.

Compared with the previous survey in 1992,¹⁶ the current survey shows increased prevalence of both primary and acquired drug resistance to four first-line drugs (Table 3). However, the results obtained from

Table 6 Resistance to any drug in 1997, by district

District	Primary resistance			Acquired resistance		
	Tested <i>n</i>	Resistant <i>n</i>	(%)	Tested <i>n</i>	Resistant <i>n</i>	(%)
Hokkaido	65	5	(7.7)	9	5	(55.6)
Tohoku	44	4	(9.1)	7	1	(14.3)
Kanto	436	41	(9.4)	75	27	(36.0)
Tokai-Hokuriku	308	34	(11.0)	50	20	(40.0)
Kinki	180	22	(12.2)	55	26	(47.3)
Chugoku-Shikoku	149	13	(8.7)	30	18	(60.0)
Kyushu	192	22	(11.5)	38	15	(39.5)

There was no significant difference in the prevalence of resistance to anti-tuberculosis drugs by district.

the two surveys can not be compared easily, because the method for drug susceptibility testing was changed from the absolute concentration method in 1992¹⁶ to the proportion method in 1997,¹⁸ with consequent changes in critical concentrations for resistance to each drug (i.e., from 1.0 µg/ml in 1992 to 0.2 µg/ml in 1997 for isoniazid, 50 µg/ml to 40 µg/ml for rifampin, 20 µg/ml to 10 µg/ml for streptomycin and 5.0 µg/ml to 2.5 µg/ml for ethambutol).

The Global Project showed that the use of standardized short-course chemotherapy (SCC) regimens in tuberculosis treatment was inversely associated with the prevalence of combined resistance to any drug; countries with MDR levels of above 2% used SCC regimens in a median of 70% of their patients, compared with 100% of patients in countries with MDR levels of under 2%.^{10,11} Although SCC including pyrazinamide was adopted as the national standard chemotherapy regimen for new pulmonary tuberculosis cases in Japan in 1996, the actual proportion of smear-positive tuberculosis patients treated with SCC regimens was less than 50% in 1997.²² This suggests a correlation between the low proportion of patients treated with SCC regimens and the high prevalence of acquired drug resistance.

Half of the previously treated cases had other disease complications such as hypertension, diabetes mellitus, cancer or hepatitis, which often result in immunosuppression. As shown in Table 5, however, no correlation was observed between the presence of concomitant disease and the high prevalence of acquired drug resistance. The prevalence of acquired drug resistance in foreign-born patients was 1.7-fold higher than in Japanese patients, although the difference was not significant. Other factors associated with such a prevalence still remain to be determined. A follow-up study of drug-resistant tuberculosis is now in progress, and may provide some indications regarding factors associated with the high prevalence of acquired drug resistance.

In the previous survey in 1992,¹⁶ primary drug resistance rates were higher in age groups under 60 years old compared to those 60 years and over. As mentioned above, most cases in the age group 60 years and over may be a reactivation of tuberculosis. The 1997 survey, however, showed an increased resistance rate in older people as shown in Table 5, compared with those of the last survey. This implies that reinfection with *M. tuberculosis* as well as the reactivation of tuberculosis may occur in older people, most of whom have other diseases and may have suppressed immunity systems. This hypothesis can be further supported by the outbreaks of tuberculosis occurring among older people. These results suggest that our present understanding of tuberculosis immunology, that individuals once infected with tubercle bacilli may have immunity to tuberculosis throughout their life-time, should be modified.

Acknowledgements

This study was partly supported by Health Sciences Research grant from the Ministry of Health Welfare of Japan (Research on emerging and re-emerging infectious diseases).

References

- Herrera D, Cano R, Godoy P, et al. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak on an HIV ward—Madrid, Spain, 1991–1995. *MMWR* 1996; 45: 330–333.
- Monno L, Angarano G, Carbonara S, et al. Emergence of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected patients. *Lancet* 1991; 337: 852.
- Barnes P F, Bloch A B, Davidson P T, Snider D E Jr. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 1644–1650.
- Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial transmission multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons—Florida and New York, 1988–1991. *MMWR* 1991; 40: 585–591.
- Dooley S W, Jarvis W R, Marlone W J, Snider D E Jr. Multi-drug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 257–259.
- Snider D E Jr, Roper W L. The new tuberculosis. *N Engl J Med* 1992; 326: 703–705.
- WHO/IUATLD Global Working Group on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/96.216. Geneva: WHO, 1997.
- Bass J B Jr, Farer L S, Hopewell P C, et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1359–1374.
- WHO. Tuberculosis programme: framework for effective tuberculosis control. Publication no. WHO/TB/94.179. Geneva: WHO, 1994.
- Pablos-Mendez A, Raviglione M C, Laszlo A, et al. Global surveillance for antituberculosis drug resistance, 1994–1997. *N Engl J Med* 1998; 338: 1641–1649.
- WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB/97.229. Geneva: WHO, 1998.
- Ryohken. Primary drug resistance to the major anti-tuberculosis drugs in Japan. *Tubercle* 1970; 51: 152–171.
- Ryohken. A study on prevalence of resistance to major drugs among newly admitted pulmonary tuberculosis patients in 1972: comparison of results in 1972 with those in 1957, 1959, 1961, 1963, 1966, and 1969. *Kekkaku* 1975; 50: 1–8.
- Ryohken. A study on prevalence of resistance to primary and secondary drugs among newly admitted pulmonary tuberculosis patients in 1977: comparison of results in 1977 with those in 1957, 1959, 1961, 1963, 1966, 1969, and 1972. *Kekkaku* 1979; 54: 515–522.
- Ryohken. A study of drug resistance of newly admitted pulmonary tuberculosis patients: prevalence of drug resistance according to the sensitivity test at local laboratories, and its trend over twenty-five years in Japan. *Kekkaku* 1991; 66: 367–373.
- Hirano K, Kazumi Y, Abe, C, Mori T, Aoki M, Aoyagi T. Resistance to antituberculosis drugs in Japan. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77: 130–135.
- Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3693–3697.
- Japanese Society for Tuberculosis. Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Kekkaku* 1997; 72: 597–598.
- Canetti G, Froman S, Grosset J, et al. *Mycobacteria*: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 1963; 29: 565–578.

- 20 Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 21-43.
- 21 Ohmori M. Estimating the year of eradication of tuberculosis in Japan. *Kekkaku* 1994; 69: 575-579.
- 22 Ministry of Health and Welfare. Statistics of tuberculosis, 1998. Tokyo: Japan Anti-Tuberculosis Association, 1998.

APPENDIX

Cooperating investigators were: F Kishi, M Shinagawa (National Sapporo-Minami Hospital); T Nakabayashi, Y Araya (National Hakodate Hospital); H Watanabe, N Kawashima (Hakodate Municipal Hospital); K Kusashima, M Nagata (National Obihiro Hospital); N Sasaki, T Ogasa (National Douhoku Hospital); A Ebina (Aomori Prefectural Central Hospital); K Okudera, K Fukushichi (Hirosaki Central Hospital); K Takeuchi (Iwate Prefectural Central Hospital); M Sato (National Morioka Hospital); K Kimura, K Wagatsuma (Hiraka General Hospital); K Zayasu (National Miyagi Hospital); H Ishikawa, Y Komatsu (National Fukushima Hospital); T Saito (National Seiranso Hospital); K Fukuda, K Aoki (National Kasumigaura Hospital); M Morimoto (Saitama Hospital); T Aoyagi, T Kawashiro, T Toyoda (National Higashi-Saitama Hospital); F Yamagishi, Y Sasaki (National Chiba-Higashi Hospital); S Kondo (Tokyo Metropolitan Kiyose Children's Hospital); M Mohri, K Machida (National Tokyo Hospital); H Sugita (Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association [JATA]); C Abe, K Hirano, M Wada, T Mori (Research Institute of Tuberculosis, JATA); M Aoki (JATA); M Morimoto (Shinyamanote Hospital, JATA); H Suzuki, N Okada (Tokyo Metropolitan Fuchu Hospital); M Ito, T Endo (Yurin Hospital, Tokyo Yurinkai); T Kobayashi (Tokyo Saiseikai Central Hospital); K Kobayashi (Self Defence Force Central Hospital); T Fujino, T Suzuki (National Kanagawa Hospital); K Kawada (National Minami-Yokohama Hospital); S Hamano, M Kuwabara (General Sagami Kosei Hospital); A Kondo, K Wada, M Ogawa (National Nishi-Niigata Chuo Hospital); K Sato (Nagaoka Red Cross Hospital); A Matsushima, T Yasuda, H Hyakkoku (National Nanao Hospital); Y

Ohba (National Toyama Hospital); Y Nakatsumi, H Ohnishi (Kanazawa Municipal Hospital); M Narata, H Ohmori (Okayaenrei Hospital); T Mizuno, M Nakamura (Seirei Mikatabara Hospital); A Honda, K Ito (Shizuoka General Hospital); S Yamori, Y Fukaya (National Chubu Hospital); Y Kondo, Y Hashimoto (Tosei General Hospital); K Toyoda, Y Iwata (Aihoku Hospital); M Sasamoto, K Yoshikawa (National Higashi-Nagoya Hospital); T Suruda (National Wakayama Hospital); H Kashiwagi (National Meisei Hospital); T Sekikawa, K Kato (Vories Memorial Hospital); T Takashima, C Nakasone (Osaka Prefectural Habikino Hospital); E Tsubura, M Yamanaka (Osaka Hospital, JATA); M Yamanashi, M Fukunaka (Yamanashi Hospital); M Sakatani (National Kinki Central Hospital); Y-H Lee (Kyowa Hospital); M Murayama (Chest Disease Research Institute, Kyoto University); M Nakagawa, Y Iwasaki (Kyoto Prefectural Medical University); H Iwasaki, T Sakashita (Nishi-Kobe Medical Center); Y Tani (Tanimukai Hospital); S Kawahara (National Minami-Okayama Hospital); H Miyamoto, M Kurihara (Okayama City Hospital); J Okimoto (Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical University); T Matsushima, K Hashiguchi (Kawasaki Medical University Hospital); J Nose, T Hatsuoka (National Nishi-Tottori Hospital); E Shigeto (National Hiroshima Hospital); S Shishido (National Matsue Hospital); K Taniguchi (National Takamatsu Hospital); M Kitamuro, H Fujikawa (National Nishi-Kagawa Hospital); T Sugimoto, K Sugimoto (National Higashi-Tokushima Hospital); T Motoki (National Higashi-Kochi Hospital); K Machida, M Abe (Kochi Municipal Central Hospital); T Nakayama (Kochi Municipal Hospital); T Ishibashi, Y Harada (National Ohmura Hospital); T Ikeda, A Yoshida (National Minami-Fukuoka Chest Hospital); Y Nitta, H Ishii, M Tanaka (Onga Hospital); T Oe, K Irimura (National Higashi-Saga Hospital); S Tatsukawa, H Yoshino (National Nishi-Beppu Hospital); H Ishihata, S Enomoto (National Miyazaki-Higashi Hospital); K Tomono, S Kohno (Nagasaki University Hospital); H Tanaka (National Kawatana Hospital); Y Dotsu (Nagasaki Municipal Medical Center); K Shimazu (National Kumamoto-Minami Hospital); H Ogawa (National Misumi Hospital); M Takaoka, H Kuroki (Seishinkai Takaoka Hospital); M Kyuba (National Okinawa Hospital).

RÉSUMÉ

CADRE : Cinq années après la dernière enquête concernant la tuberculose à germes résistants au Japon, le Comité de Recherche de la Tuberculose a mené une enquête nationale.

OBJECTIF : Déterminer la prévalence de la résistance à l'égard de quatre médicaments antituberculeux de première ligne ainsi que ses facteurs de risque.

SCHEMA : Pendant une période de 6 mois, du 1er juin au 30 novembre de 1997, on a recueilli les cultures provenant de patients hospitalisés dans 78 hôpitaux de divers districts du Japon. Les tests de sensibilité aux médicaments ont été effectués à l'Institut de Recherche de la Tuberculose, Tokyo, un des laboratoires de référence supranationaux du projet mondial OMS/UICTMR.

RÉSULTATS ET CONCLUSION : Parmi les patients en primo-traitement, la résistance à un quelconque des quatre médicaments est observée dans 10,3%, et la prévalence de la multirésistance (MDR) primaire est de 0,8%. La prévalence de la résistance acquise est de 42,4% pour l'un quelconque des quatre médicaments et de 19,7% pour MDR, ce qui indique un taux de prévalence élevé par comparaison avec ceux du projet mondial de l'OMS/UICTMR. Environ 73% des isolats résistants aux médicaments provenant de nouveaux cas ne sont résistants qu'à un médicament, alors que 64,3% des isolats résistants dans les cas de retraitement sont résistants à deux médicaments ou davantage ($P < 0.0001$). On n'a observé aucune différence significative dans les taux de

résistance en rapport avec le sexe, le groupe d'âge, la nationalité, le district et/ou la co-morbidité dans aucun des cas de primo- ou de retraitement. D'autres facteurs

associés avec la forte prévalence dans les cas de retraitement restent à déterminer.

RESUMEN

MARCO DE REFERENCIA: Después de 5 años de la última encuesta de drogo-resistencia a la tuberculosis en Japón, el Comité de Investigación de la Tuberculosis realizó una encuesta nacional.

OBJETIVO: Determinar la prevalencia de la resistencia a las cuatro drogas antituberculosas de primera línea y los factores de riesgo.

MÉTODO: Se obtuvieron cultivos de los pacientes internados en 78 hospitales en varios distritos de Japón, en un período de 6 meses, del 1° de junio al 30 de noviembre de 1997. Los tests de sensibilidad se efectuaron en el Instituto de Investigación de la Tuberculosis, Tokio, uno de los laboratorios supranacionales de referencia del proyecto mundial OMS/UICTER.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN: Entre los pacientes sin tratamiento previo la resistencia a cualquiera de las cua-

tro drogas fue de un 10,3%, la prevalencia de la multiresistencia (MDR) primaria fue de 0,8%, y la prevalencia de la resistencia adquirida fue del 42,4% para cualquiera de las cuatro drogas y del 19,7% para la MDR, lo que indica una tasa alta de prevalencia si se la compara con el proyecto mundial de OMS/UICTER. Cerca del 73% de las cepas drogo-resistentes aisladas de los casos nuevos lo eran a una sola droga, mientras que el 64,8% de las cepas aisladas de los casos de retratamiento eran resistentes a dos o más drogas ($P < 0,0001$). No se observaron diferencias significativas en las tasas de resistencia en relación con el sexo, grupo etario, nacionalidad, distrito y/o enfermedades asociadas en los casos nuevos o en los retratados. Quedan por determinar otros factores asociados con la alta prevalencia en los casos de retratamiento.

原 著

Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出

¹阿部千代治 ²尾形 英雄 ³河田 兼光 ⁴平賀 通
⁵高嶋 哲也 ⁶末竹 寿紀

¹結核予防会結核研究所, ²結核予防会複十字病院,
³国立療養所南横浜病院, ⁴国立療養所刀根山病院,
⁵大阪府立羽曳野病院, ⁶株式会社ニッショー総合研究所

DETECTION OF RIFAMPIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY LINE PROBE ASSAY (LiPA)

¹*Chiyoji ABE, ²Hideo OGATA, ³Kanemitsu KAWATA, ⁴Toru HIRAGA,
⁵Tetsuya TAKASHIMA, and ⁶Toshinori SUETAKE

¹*Research Institute of Tuberculosis and ²Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association,
³National Minami-Yokohama Hospital, ⁴Toneyama National Hospital,
⁵Osaka Prefectural Habikino Hospital, ⁶Nissho Corporation

A recently described reverse hybridization-based line probe assay is used for the rapid detection of the mutations in the *rpoB* genes of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and for the identification of the *M. tuberculosis* complex. A multicenter study that included 5 laboratories was performed to evaluate the line probe assay in comparison with the *in vitro* susceptibility test. A total of 406 mycobacteria isolates which were composed of 103 rifampin-resistant and 230 rifampin-susceptible *M. tuberculosis* isolates, and 73 mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT), were subjected to this study. All 333 *M. tuberculosis* isolates were discriminated correctly from MOTT bacilli by a line probe assay. Concordance rates with sequencing results for five wild-type probes (S probes) and four specific mutations (R probes) for detecting the mutations in the *rpoB* genes were both 100%. The overall concordance rate with the *in vitro* susceptibility testing results was 98.5% (328 of 333 isolates). These results indicate that a line probe assay kit may be useful for the rapid diagnosis of rifampin-resistant tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* gene, rifampin resistance, line probe assay

キーワード: 結核菌, *rpoB* 遺伝子, リファンピシン耐性, ラインプローブアッセイ

*〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

*3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.
 (Received 5 Jun. 2000/Accepted 21 Jun. 2000)

はじめに

1970年代まで結核罹患率は順調に減少してきたが1980年頃よりその減少速度に鈍化がみられ、ここ1~2年はその傾向がより顕著になった。また集団感染や病院内感染も年々増加している。さらに一番恐れていた薬剤耐性菌による感染、とりわけイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を獲得している多剤耐性結核菌 (MDR-TB) による集団感染も報告されている。厚生省はこのような結核の状況を踏まえ1999年7月に結核緊急事態宣言を発表した。

わが国では、結核菌の薬剤感受性試験を結核菌検査指針 (1979年; 厚生省監修) に基づき1%小川法で行っている。しかし、培地製造中および保存中に起こる卵培地への薬剤の吸着や試験結果が得られるまでに要する時間の長さが問題にされている。

近年分子遺伝学的手法の導入により結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子がINH¹⁾²⁾, RFP^{3)~8)}, ピラジナミド (PZA)⁹⁾¹⁰⁾, ストレプトマイシン (SM)¹¹⁾, エタンブトール (EB)¹²⁾, カナマイシン (KM)¹³⁾, フルオロキノロン耐性菌¹⁴⁾などで明らかにされている。RFP耐性については、耐性菌の95%以上がRNAポリメラーゼのβサブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異がみられる。しかもその変異は23個のアミノ酸 (69 bp) からなるホットスポット領域に集中していることから遺伝子による検査が可能である。

Innogenetics 社 (ベルギー) により開発された INNO-LiPA Rif. TB は、リバースハイブリダイゼーション法に基づいた line probe 法 (LiPA) による結核菌群の鑑別に加え *rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異を検出するキットである^{15)~18)}。検出に要する時間は、遺伝子の増幅を含め約5時間であり迅速にRFPに対する感受性が判定できる。今回、多施設共同で INNO-LiPA Rif. TB の有用性を評価した。

材料と方法

1. 使用菌株

1997年2月から1999年11月までの間に結核予防会複十字病院、国立療養所南横浜病院、国立療養所刀根山病院、大阪府立羽曳野病院で分離された結核菌333株および非結核性抗酸菌73株を研究に用いた。抗酸菌の鑑別・同定はアキュプローブ結核菌群およびマイコバクテリウム アビウム コンプレックス鑑別試験と DDH マイコバクテリアキットで行った。

2. 感受性試験

RFP に対する結核菌の感受性試験について、各施設では従来からの絶対濃度法 (基準値: 50 μg/ml), 結

核予防会結核研究所では日本結核病学会から新しく提案された比率法¹⁹⁾ (基準値: 40 μg/ml) を用いて行った。

3. PCR による *rpoB* 遺伝子の増幅

小川培地全面から約1/2エーゼの菌を採取し、0.5 ml の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した。100℃で10分間処理後 PCR に用いた。*rpoB* 遺伝子の256 bp 増幅のために5'末端をビオチン標識した次の2つのプライマーを使用した; IP 1 (5'-GGT CGG CAT GTC GCG GAT GG-3') と IP 2 (5'-GCA CGT CGC GGA CCT CCA GC-3')。増幅のために、95℃ 60秒間の熱変性、55℃ 60秒間のアニーリング、72℃ 60秒間の合成の反応を30サイクル行った。最後に72℃に10分間保った。得られた増幅産物を LiPA 試験に用いた。

4. LiPA による変異の検出

line probe 法はリバースハイブリダイゼーションの原理に基づいた方法である。大きさが3×50 mm のストリップに特異的オリゴヌクレオチドがコートされており、厳しい条件下にビオチン標識 PCR 産物との間でハイブリダイゼーションが行われた。結合した DNA はアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンと BCIP/NBT 発色液を用いる系で検出した。ハイブリダイゼーション反応は0.1% SDS を含む SSC 緩衝液 (0.15M NaCl+0.015M クエン酸ナトリウム) を用い62℃で行った。ハイブリダイゼーションを含む一連の検出反応に自動化システム (AUTO-LiPA, Innogenetics, ベルギー) を用いた。詳細な操作手順を Table 1 に示した。

ストリップには発色を確認するためのプローブと結核菌群特異的プローブおよび9種の *rpoB* 遺伝子プローブがコートされている (Fig. 1)。19~23個の塩基からなる部分的に重複した5種の S プローブ (S1~S5) は野生型塩基配列とハイブリダイズする。もしこれらの領域に変異が存在すれば相当するプローブとは反応しない。加えて高頻度にみられる変異を確認するために4種の R プローブ (R2: Asp-516-Val, R4a: His-526-Tyr, R4b: His-526-Asp, R5: Ser-531-Leu) が S プローブの下に固定されている (Fig. 2)。

5. 塩基配列の決定

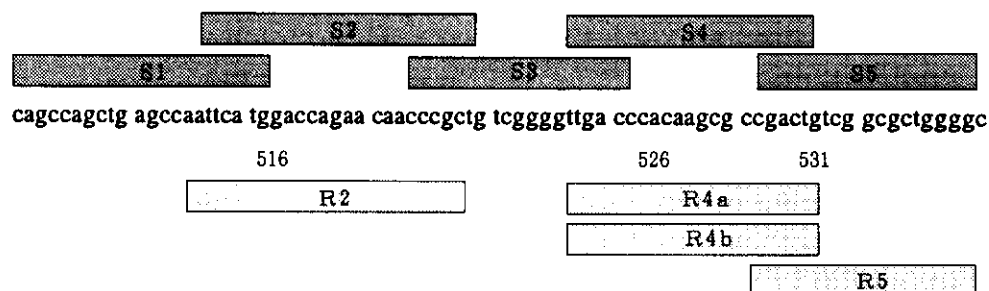
rpoB 遺伝子の塩基配列は Gene Rapid SEQ4×4 personal sequencing system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて決定した。

結 果

対象とした結核菌333株と非結核性抗酸菌73株の INNO-LiPA Rif. TB キットによる結核菌群の鑑別結果を Table 2 に示した。結核菌はすべて結核菌群特異

Table 1 Assay procedure

Step 1. Hybridization	
①	Add 10 μ l of the denaturation solution into each test trough
②	Add 10 μ l of the amplified product into a drop of the denaturation solution, mix with pipette, and incubate at 20–25 $^{\circ}$ C for 5 min
③	Add 1 ml of a pre-warmed (37–62 $^{\circ}$ C) hybridization solution to a denatured sample, and mix gently
④	Add a LiPA strip into each test trough
⑤	Incubate them at 62 $^{\circ}$ C for 30 min
Step 2. Stringent wash (62 $^{\circ}$ C)	
①	Aspirate the hybridization solution from each test trough
②	Wash strips twice with 1 ml of a pre-warmed (37–62 $^{\circ}$ C) stringent wash solution
③	Add 1 ml of a pre-warmed stringent wash solution
④	Incubate at 62 $^{\circ}$ C for 10 min
Step 3. Color development (20–25 $^{\circ}$ C)	
①	Aspirate the hybridization solution from each test trough
②	Rinse twice with 1 ml of a rinse solution for 1 min
③	Add 1 ml of a conjugate solution, and incubate for 30 min
④	Rinse twice with 1 ml of a rinse solution for 1 min
⑤	Rinse once with 1 ml of a substrate buffer for 1 min
⑥	Incubate with 1 ml of a substrate buffer for 30 min
⑦	Incubate with 1 ml of distilled water for 5 min

Fig. 1 Positions of S and R probes on the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*.

The wild-type (WT) nucleotide sequences in the 69-bp hyper-variable region of the *rpoB* gene are presented as described by Telenti et al.⁴⁾. S1 through S5, probes for WT sequences. Probes for specific mutations were as follows: R2, Asp-516-Val; R4a, His-526-Tyr; R4b, His-526-Asp; R5, Ser-531-Leu.

プローブと陽性反応を示したが非結核性抗酸菌はすべて陰性であり、特異性は100%であった。

分離結核菌について、各施設では従来からの絶対濃度法でRFPに対する感受性試験を行った。耐性菌はすべて結核予防会結核研究所に送付され、日本結核病学会から新しく提案された比率法で再検査された。4施設で分離された結核菌333株のうち230株はRFP感受性であり、103株はRFP耐性であった。

LiPAにより試験した結核菌333株の結果をTable 3

に示した。感受性試験でRFP耐性の表現型を示した103株のうち99株(96.1%)はLiPA試験でも変異型を示したが4株(3.9%)は野生型のプロファイルであった。一方RFP感受性230株の99.6%(229株)はLiPA試験でも一致した結果(野生型プロファイル)であった。感受性試験とLiPAの結果が一致しなかった5株について*rpoB*遺伝子のホットスポット領域の塩基配列を調べた。感受性試験で耐性であったにもかかわらずLiPAで野生型のプロファイルを示した4株はすべて野生型の

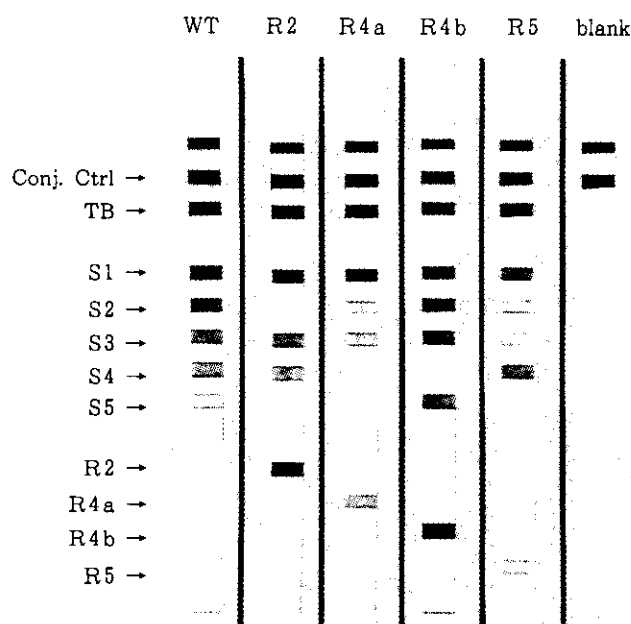


Fig. 2 Representative hybridization patterns obtained with line probe strips.

The conjugate control line (Conj. Ctrl) provides an internal control for the color development reaction. The TB line is a specific probe for the *M. tuberculosis* complex. The S and R probes are described in the legend to Fig. 1.

Table 2 Identification of the *M. tuberculosis* complex by line probe assay

Isolates (n)	Reaction with TB probe	
	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> (333)	333	0
MOTT ^a (73)	0	73
Total (406)	333	73

^a Mycobacteria other than *M. tuberculosis*

塩基配列であった (Table 4)。また RFP に対する感受性試験で感受性の表現型を示したにもかかわらず LiPA 試験で Δ S1 変異の結果を与えたサンプル No. 100 は 511 番目のコドンに ctg \rightarrow cCg の変異 (Δ S1) を持っていた。1% 小川培地で最小発育阻止濃度を調べたとき、サンプル No. 100 の MIC 値は 40 μ g/ml であり、RFP 低度耐性菌であることが分かった。

培養による感受性試験との比較で、RFP 耐性株の検出キット LiPA の感度は 96.1%、特異性は 99.6%、全体の一致率は 98.5% であった。

考 察

世界保健機関 (WHO) と国際結核肺疾患予防連合 (IUATLD) は 1994 年に世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを開始し、これまでに 35 の国と地域からその成績が報告された²⁰⁾。MDR-TB の頻度が比較的高い国がいくつかあり、これらの国では結核対策プログラムを遂行するうえで脅威となっている。結核療法研究協議会の 1997 年の成績²¹⁾によると、わが国でも 5 年前と比べて MDR-TB の頻度が上昇していることが明らかになった。MDR-TB 患者の治療は非常に困難であり、より強力な治療と高額な治療費を必要とする^{22) 23)}。

一般に RFP 耐性の頻度は INH 耐性や SM 耐性より低い²⁰⁾、RFP 耐性菌はしばしば INH 耐性を伴う^{24) 25)}。それゆえ適切な患者の治療と結核対策のために、迅速で信頼性の高い結核菌の検出および薬剤感受性試験法の開発が望まれている。

RFP の作用機構は RNA ポリメラーゼの β サブユニットに薬剤が結合することにより RNA の伸長と転写に影響を与えるものと考えられている。RFP 耐性結核菌の約 95% は、 β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺

Table 3 Comparison of the results of the line probe assay with the *in vitro* susceptibility test

Susceptibility (n)	LiPA profile [No. (%) of isolates]	
	Mutation	Wild type
RFP-resistant (103)	99 (96.1)	4 (3.9)
RFP-sensitive (230)	1 (0.4)	229 (99.6)
Total (333)	100	232

Table 4 Discrepant results between *in vitro* susceptibility test and line probe assay

Sample	Susceptibility	LiPA profile	Sequencing ^a
100	Sensitive	Δ S1	511 cCg (Δ S1)
144	Resistant	Wild type	Wild type
170	Resistant	Wild type	Wild type
294	Resistant	Wild type	Wild type
322	Resistant	Wild type	Wild type

^a Capital letter in the codon indicates the change in nucleotide sequence.

伝子の約69塩基対からなるホットスポット領域に変異を持つが、感受性株には変異がみられないことが報告されている。INNO LiPA Rif. TBはリバースハイブリダイゼーションに基づいた方法であり、*rpoB* 遺伝子の変異を迅速に検出するキットである。結核菌臨床分離菌333株のうち328株(98.5%)はLiPAキットで正しくRFP感受性またはRFP耐性に判定できた(Table 3)。しかし培養法で耐性であった4株はLiPAで感受性のプロファイル(野生型)を示した。これら4株について、*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の塩基配列を調べたが、変異は認められずLiPAと一致した結果であった。これらの患者は治療成績からも多剤耐性結核と診断されており、分離菌はRFP耐性であった。RFP耐性結核菌の約5%はホットスポット領域に変異を検出できないことが他の報告にもみられる。これらの結果は、*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異に加え、他領域の変異または*rpoB* 遺伝子以外の遺伝子がRFP耐性に関与することを暗示している。同時に、このホットスポット領域を用いた試験では野生型と判定された株の中に5%程度RFP耐性菌が含まれることを留意する必要があることを示している。

培養法で感受性であった結核菌230株のうち1株(0.4%)はLiPAで耐性のプロファイル(Δ S1)を示した(Table 3とTable 4)。塩基配列の分析成績もアミノ酸置換(Leu511Pro)を示しており、LiPAの結果を支持

していた。培養法による感受性試験と異なる結果を示したサンプルNo.100に対するRFPのMIC値は40μg/ml(1%小川培地による試験)であり、RFPに低度の耐性を獲得している菌であることが分かった。この患者は既治療例であったが、分離株は他の抗結核薬すべてに感受性であり標準化学療法で菌陰性化できた例である。

Table 5に示したように、高頻度に変異がみられたコドンはSer-531(54.4%, 56/103), His-526(7.8%, 8/103)およびAsp-516(10.7%, 11/103)であった。主にヨーロッパとアフリカで分離された結核菌を調べたRossauら¹⁵⁾、アジア諸国で分離された結核菌を用いたHiranoら¹⁶⁾、台湾で分離された結核菌を調べたLiuら¹⁸⁾およびニューヨーク市で分離された結核菌を分析したCookseyら¹⁷⁾の成績も同様であり、分離された国による偏りはみられなかった。このことはこれらのコドンでは高頻度に突然変異が起こることを示している。

2つのコドンに変異を持つ培養がLiPAにより6例検出され、変異は塩基配列の分析からも確認された。また野生型とR5のプロファイルを示した株(1株)は、遺伝子型の異なる菌の混在を示しており、このような場合でもLiPAにより変異の検出が可能であることが分かった。RFP耐性結核菌分離株の*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域に挿入変異あるいは欠失変異を持つ株が存在すること^{5) 16) 17)}、これらの中でPhe-514の挿入変異をLiPAキットで検出できない^{16) 17)}ことが報告されてい

Table 5 Frequency of mutations in rifampin-resistant isolates reported by five groups

LiPA profile	Frequency of mutations [No. (%) of isolates] ^a				
	This study	Rossau et al.	Hirano et al.	Liu et al.	Cooksey et al.
Wild type	4 (3.9)	4 (2.0)	6 (6.7)	5 (10)	5 (9.8)
Δ S1	8 (7.8)	3 (1.5)	6 (6.7)	7 (14)	1 (2.0)
Δ S2	0	5 (2.5)	1 (1.1)	0	2 (3.9)
Δ S3	2 (1.9)	7 (3.5)	1 (1.1)	0	0
Δ S4	3 (2.9)	20 (10.0)	3 (3.3)	8 (16)	0
Δ S5	7 (6.8)	17 (8.5)	2 (2.2)	0	2 (3.9)
R2	10 (9.7)	15 (7.5)	12 (13.3)	4 (8)	2 (3.9)
R4a	5 (4.9)	19 (9.5)	8 (8.9)	1 (2)	20 (39.2)
R4b	3 (2.9)	21 (10.5)	4 (4.4)	0	2 (3.9)
R5	54 (52.4)	86 (43.0)	46 (51.1)	23 (46)	17 (33.3)
Other	7 (6.8) ^b	3 (1.5) ^c	1 (1.1) ^d	2 (4) ^e	0
Total	103	200	90	50	51

^a Refer to the reports by Rossau et al.¹⁵⁾, Hirano et al.¹⁶⁾, Liu et al.¹⁸⁾, and Cooksey et al.¹⁷⁾

^b Δ S1/Δ S2 (1 strain), Δ S1/R2(1), Δ S2/Δ S3(3), Δ S2/R5(1), and WT/R5(1)

^c WT/R4a(1), WT/R5(1), and WT/R4a/R5(1)

^d WT/R2(1)

^e Δ S1/Δ S4(1) and WT/R2(1)

る。しかし、この種の変異を持つ結核菌は今回検討した333株に含まれていなかった。

AUTO-LiPA はハイブリダイゼーションから発色までの操作を完全に自動化したシステムである。INNO-LiPA Rif. TB は、菌株の入手後 PCR による *rpoB* 遺伝子の増幅 (3 時間)、その後 AUTO-LiPA による変異の検出 (2 時間) まで約 5 時間で RFP の感受性を検査できる迅速キットである。加えて培養法との比較で 98.5% と非常に高い一致率を示した。1993 年に米国の CDC は鑑別・同定と薬剤感受性を含めたすべての検査成績を 4 週間以内に臨床医のもとに報告すべきであると勧告した²⁶⁾。わが国では従来から小川培地を初代分離および薬剤感受性試験に用いており、すべての検査結果が得られるまでに早くても 2 カ月を要していた。LiPA は重要な抗結核薬の 1 つである RFP に対する感受性を数時間で検査できることから、初代分離に小川培地を用いた場合でも CDC の勧告が満たされ、その使用は臨床の場で非常に有用と考えられる。

文 献

- 1) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase - peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992; 358: 591-593.
- 2) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994; 263: 227-230.
- 3) Jin D, Gross CA: Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1989; 171: 5229-5231.
- 4) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 5) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2380-2386.
- 6) Suzuki Y, Katsukawa C, Inoue K, et al.: Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Jpn Assoc Infect Dis*. 1995; 69: 413-419.
- 7) Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, et al.: Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1996; 144: 103-108.
- 8) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relation-

- ship between rifampin MICs and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1053-1056.
- 9) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996; 2: 662-667.
- 10) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis.* 1998; 78: 117-122.
- 11) Finken M, Kirschner P, Meier A, et al.: Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* 1993; 9: 1239-1246.
- 12) Sreevatsan S, Stochbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1677-1681.
- 13) Taniguchi H, Chang B, Abe C, et al.: Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol.* 1997; 179: 4795-4801.
- 14) Cambau E, Sougakoff W, Besson M, et al.: Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis.* 1994; 170: 479-483.
- 15) Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif.TB assay, a reverse hybridization assay for the stimulation detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2093-2098.
- 16) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2663-2666.
- 17) Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, et al.: Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1281-1283.
- 18) Liu Y-C, Huang T-S, Huang W-K: Line probe assay for rapid detection of mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Formos Med Assoc.* 1999; 98: 582-585.
- 19) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会: 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入への提案. *結核.* 1997; 72: 597-598.
- 20) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. 1998, Publication no. WHO/TB/97.229. WHO, Geneva, Switzerland.
- 21) 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究. 1997. 平成11年度療研研究報告書.
- 22) Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al.: Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med.* 1993; 328: 527-532.
- 23) Mahmoudi A, Iseman MD: Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. *JAMA.* 1993; 270: 65-68.
- 24) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al.: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* 1994; 344: 293-298.
- 25) Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al.: Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1969-1973.
- 26) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 767-770.

結核菌検査の進歩と実際

阿 部 千 代 治

はじめに

ここ10数年の間に抗酸菌の細菌学的検査に大きな進歩が見られた¹⁾。それらは分離培養への液体培地の導入、核酸増幅法による結核菌の迅速検出、核酸の相同性や菌種特異抗原に対する抗体を用いる菌種の鑑別同定、耐性に関与する遺伝子を用いる耐性菌の検出(研究段階)などである。ここでは液体培地による初代分離と核酸増幅法による結核菌の迅速検出および薬剤感受性試験の新しい方向について述べる。

I. 分離培養法

これまでも液体培地の有効性を否定する研究者はいなかったが、同時に前処理後でも材料中に生残する抗酸菌以外の微生物の増殖も高めることが予想され、わが国では使われなかった。欧米諸国においては選択培地の開発に力が注がれ、5種の薬剤からなる抗菌補助剤 PANTA (ポリミキシン B, アンフォテリシン B, ナリジクス酸, トリメソプリム, アズロシリン) が確立された。これは液体培地を用いる新しい培養法の開発を可能にした。抗酸菌の検出に新しい考えを取り入れた培養法を以下に述べる。

1. 液体培地を基礎とした培養システム

1) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, Becton Dickinson)²⁾³⁾

溶存酸素に鋭敏なセンサーを用いた非放射性抗酸菌検出システムである。蛍光物質であるルテニウム化合物は酸素の無い状態で紫外線照射下に蛍光を発するが、酸素の存在下ではその蛍光が消される。菌が増殖し、培地中の溶存酸素を消費したとき酸素による蛍光の発光阻害は低下する。蛍光は365nm 波長の UV トランスイルミネーターまたは長波長 UV 光で測定できる。インキュベーターを取り込んだ全自動培養装置 MGIT 960 (1時間おきに全検体の炭

結核予防会結核研究所基礎研究部長

光度を自動監視する) が開発されており、この装置を導入することにより臨床検査室で問題とされている観察に要する労働量を軽減することが可能となった。現在、日常の検査への導入が期待されているシステムである。

2) Septi-Chek AFB (Becton Dickinson)⁴⁾

液体培地と固形培地の二相からなる培養システムである。液相部は Middlebrook 7H9 を基礎培地とし、PANTA と発育促進物質を含んでいる。スライドには3種類の固形培地(改良 Middlebrook 7H11 寒天培地, 卵加寒天培地, チョコレート寒天培地) が固められている。通常は8週まで観察し、固形培地上のコロニーの有無と液体培地中の菌の発育を検査する。

3) MB-REDOX (Biotest)⁵⁾

酸化還元インジケーター(テトラゾリウム塩)を用いた抗酸菌培養システムである。抗酸菌を含む材料を接種した試験管では増殖に伴いインジケーターは還元されピンクまたは青紫色に変わる。陽性例では着色した菌塊(formazan)が試験管の底部に観察される。場合によっては培養全体が着色することもある。鏡を用いると観察が容易である。

4) BacT/ALERT (Organon Teknika)⁶⁾

炭酸ガスに鋭敏なセンサーを用いた迅速検出システムである。ボトルの底部に炭酸ガスセンサーが取り付けられており、半透性の膜で培地と仕切られている。増殖に伴い産生される炭酸ガスは膜を通過しセンサー部に入り、水に溶けたときに次のような反応が起こり、

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$$

H⁺ イオンの濃度が高まりセンサーは淡緑色に変わり、最終的に黄色になる。これはインキュベーターを取り込んだ全自動培養装置である。

2. 新しい培養法による臨床材料からの抗酸菌の分離

液体培地を基礎とした MGIT および MB Redox

表 1 種々の培地による587喀痰材料からの抗酸菌の分離

分離株 (n)	分離株数 (%)					
	MB Redox	MGIT	2% Ogawa	MB Redox+2%小川	MGIT+2%小川	MB Redox+MGIT
結核菌(133)	115(86.5)	122(91.7)	87(65.4)	124(93.2)	128(96.2)	129(97.0)
MOTT*(70)	62(88.6)	63(90.0)	46(65.7)	66(94.3)	64(91.4)	69(98.6)
合計(203)	177(87.2)	185(91.1)	133(65.6)	190(93.6)	192(94.6)	198(97.5)

MOTT*：非結核性抗酸菌

表 2 全ての培養システムで陽性を示した材料からの検出までに要した日数

分離株 (n)	検出までに要した平均日数 (範囲)		
	MB Redox	MGIT	2%小川
結核菌(80)	16.1(3-42)	15.9(3-44)	25.7(7-62)
MOTT*(42)	11.0(4-50)	10.5(2-53)	19.4(4-70)

MOTT*：非結核性抗酸菌

システムによる抗酸菌の分離率を従来からの小川培地と比較した。3培養法で587例の喀痰材料を培養した成績を表1に示した⁵⁾。MGIT または MB Redox の検出率は小川法と比べ有意に高かった。塗抹陰性材料でその差はより顕著であった。この傾向は結核菌のみならず非結核性抗酸菌でも同様であった。また MGIT または MB Redox を用いることにより小川法より1週間早く結核菌を検出できることも分かった(表2)²⁾³⁾⁵⁾。この MGIT は小試験管を使用していることから培養に場所を取らないこと、検出感度は小川法と比べ有意に高いこと、迅速に結果が得られること、MGIT 960装置を使用した場合に検査室の仕事量が軽減されることなどから将来広く利用されるものと考えられる。また MB Redox についても操作が簡便であり導入が容易である。成績は示していないが BacT/ALERT の検出感度および検出までに要する日数は MGIT および MB Redox と同等である⁶⁾。Septi-Chek AFB は同等の検出感度を持つが迅速性の点で前三者に劣る²⁾³⁾。

3. 抗-MPB64 抗体を用いる液体培養中の結核菌の迅速鑑別

イムノクロマトグラフィー法 (ICA) は簡便で迅速な診断法として急速に普及してきた。MPB64 抗原は結核菌群に特異的であり、液体培地で培養早期に分泌される。抗-MPB64 モノクローナル抗体を用いた ICA (MPB64-ICA) は結核菌群鑑別のためのキットである⁷⁾。液体培地で抗酸菌陽性のシグナルを示した培養の100 μ l を直接 MPB64-ICA カセツ

トに注入することにより迅速 (15分以内) に結核菌群を鑑別できる。勿論固形培地培養菌の鑑別にも使用できる。

II. 核酸増幅法による結核の迅速診断

数時間のうちに試験管内で多量の DNA や RNA を増幅する技術が開発された。数コピーの核酸を検出することは困難であるが、増幅後 (10⁶ 個以上) では容易に検出できる。これらの手法は多くの分野で用いられており、培養困難な微生物の検出や迅速な診断が要求される例で特に有効であることが報告されている。結核菌検出のためのキットも既に3社から発売されている。

1. 市販のキット

1) アンプリコア・マイコバクテリア (日本ロシュ)

PCR 法を用いた増幅法であり、結核菌群、*M. avium* と *M. intracellulare* 検出同定のためのキットである。患者材料の採取後、6~7時間で試験は終了する。培養菌を用いて調べたこのキットの検出感度は10個以下である。また他の抗酸菌菌種を含む39種の微生物を標的としたときに陽性反応は認められない。

2) DNA プローブ中外-MTD (中外製薬)

結核菌のリボソーム RNA (rRNA) を増幅する方法である。Gen-Probe 社で開発した MTD 法は逆転写酵素と RNA ポリメラーゼを用いる増幅法であり、材料採取後3~4時間で10⁶ 個の RNA を増幅できる。検出感度は10個以下であり、23種の抗酸菌と肺の疾患に関連する微生物とは陽性反応が認められない。

3) LCX M. ツベルクローシス・ダイナジーン (ダイナボット)

LCX は4本のプローブと DNA 連結酵素であるリガーゼを用いて DNA を増幅する方法である。原理は、標的 DNA の1本鎖に相補的な2本のプローブが結合し、ついでプローブ間の隙間は PCR で埋

表 3 核酸増幅法と従来からの塗抹および培養法との比較

臨床材料	PCR*		MTD	
	陽性	陰性	陽性	陰性
塗抹陽性・培養陽性・結核菌	21	1	22	0
塗抹陰性・培養陽性・結核菌	5	5	7	3
MOTT 培養陽性	0	18	0	18
塗抹陽性・培養陰性	1	2	1	2
塗抹陰性・培養陰性	5	77	4	78
計	32	103	34	101

PCR* : IS6110 配列をプライマーとした PCR

め、最後に耐熱性リガーゼで連結させ2本鎖 DNA を合成する。結核菌を喀痰に添加した材料で調べた検出感度は30 CFU であった。

2. 臨床材料からの結核菌の検出

結核菌の IS6110 の 541bp DNA を増幅するための PCR と MTD の検出感度を塗抹法と Septi-Chek 法による培養と比べた。表3に示したように塗抹と培養が陽性例はほぼ全例陽性の反応を示したが、塗抹陰性・培養陽性例では PCR または MTD で陰性を示す例が少なくない⁹⁾。しかし特異性に問題はなかった。アンプリコアおよび LCX の評価成績⁹⁾⁻¹¹⁾も同様である。即ち核酸増幅法の感度は塗抹法や小川法より高いが、液体培地による培養と同等である。

3. 核酸増幅法の評価

われわれが他施設と行った精度管理に関する共同研究でのべ90の陰性サンプル中5 (5.6%)が陽性と報告された¹²⁾。偽陽性例に加えて偽陰性例も報告された。共同研究を計3回行った。施設間で意見の交換を行った結果、研究を繰り返すたびに検査精度に大きな改善が見られた¹²⁾⁻¹³⁾。このことは定期的に精度管理をする必要があることを示している。従来からの塗抹と培養法はそれぞれが重要な検査であり、核酸増幅法で代行することはできない。米国の CDC も同様のコメントを出している。しかし増幅酵素阻害物質の問題は残るが、結核菌の検出がまれな喀痰以外の材料や結核の病気の進行が早いエイズ患者の診断には特に有効と思われる。この検査はコストの高い検査であり、経済性と検出感度を考慮し3日分の患者材料をまとめて検査することを勧める。

Ⅲ. 薬剤感受性試験

米国初めヨーロッパ諸国において特に HIV 感染

表 4 結核菌の薬剤感受性試験濃度

抗結核薬	略号	試験薬濃度 (μg/ml)	
		従来法	新しい提案
イソニアジド	INH	0.1, 1, 5	0.2, 1
リファンピシン	RFP	10, 50	40
ピラジナミド	PZA		
ストレプトマイシン	SM	20, 200	10
エタンブトール	EB	2.5, 5	2.5
カナマイシン	KM	25, 100	20
カプレオマイシン	CPM	25, 100	20
エンビオマイシン	EVM	25, 100	20
エチオナミド	TH	25, 50	20
サイクロセリン	CS	20, 40	30
パラアミノサリチル酸	PAS	1, 10	0.5
レボフロキサシン	LVFX		1.0

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¹⁴⁾。最も効果的な薬剤であるイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) を含む複数の薬剤に耐性を獲得している結核菌による感染であり、極端に高い死亡率が報告されている。日本でも複数の薬剤に耐性を獲得している結核菌による感染が頻発しており薬剤感受性試験の重要性が高まっている。

1. 日本結核病学会から提案された比率法

従来からの1%小川培地を用いる薬剤感受性試験について、用いている方法、試験濃度や判定方法について結核専門医の間に検討を望む意見が以前からあった。日本結核病学会では1996年に薬剤耐性検査検討委員会を設置し検討を重ね、1997年6月に小川培地を用いる比率法を新しい薬剤感受性試験法として提案した(表4)¹⁵⁾。従来法との違いは試験濃度を1濃度にしたこと、Canettiら¹⁶⁾により研究され、諸外国で用いられている濃度が採用されたことである。また判定について、耐性菌の割合が1%以上になれば1~2ヵ月以内に大多数が耐性菌で占められるようになるとする考えから耐性菌の割合が1%未満を感受性、1%以上を耐性とすることにした。現在、新しい薬剤感受性試験培地の製造に向けて培地メーカー各社で準備中である。

2. 寒天培地および液体培地による試験

米国の NCCLS は薬剤感受性試験の精度管理のためには卵培地ではなく Middlebrook の寒天培地または液体培地の使用を推奨している¹⁷⁾。MGIT システムは有効な培養システムである。MGIT による薬剤感受性試験の成績は BACTEC や卵培地を用いて行った試験の成績と良く相関することが報告された。また5~10日で結果の判定が可能であり、迅速感受

表5 薬剤耐性結核菌の耐性に関与する遺伝子の変異の頻度

抗結核薬	遺伝子	遺伝子の変異 (%)	野生型配列 (%)
INH	<i>katG</i> , <i>inhA</i> <i>ahpC</i> , <i>kasA</i>	92	8
RFP	<i>rpoB</i>	95	5
PZA	<i>pncA</i>	97	3
SM	<i>rpsL</i> , <i>rrs</i>	70	30
FQ*	<i>gyrA</i>	70	30

FQ*：フルオロキノロン

性試験法として日常検査への導入が待たれる。

3. 薬剤耐性に関与する遺伝子の変異

結核菌の薬剤耐性は自然に生ずる突然変異によるものと結論されている。これらの耐性菌は薬剤と接触前の結核菌集団に含まれており、治療中に選択される。結核菌の薬剤耐性を支配するのはゲノム遺伝子と考えられており、一般細菌で見られる耐性プラスミド分離の報告はない。薬剤耐性に関与する遺伝子の研究はINH, RFP, SM, PZA, EB, KM, フルオロキノロン耐性菌で進められており、少しずつ明らかにされてきた(表5)。耐性に関与する遺伝子の変異の検出についても、DNAチップ法¹⁸⁾、ラインプローブ法¹⁹⁾、分子ビーコン法などが研究開発された。一部の薬剤については既にキットによる検出も可能となったが、大部分の薬剤は複数の分子機構により耐性の発現が起こっていることなどから、日常の検査に応用できるまでにはさらに年月を要するであろう。

お わ り に

1993年に米国のCDC(疾病対策予防センター)は、結核患者の適切な管理と治療のために分離結核菌の同定と感受性試験の成績を30日以内に臨床医に報告することを求めている²⁰⁾。しかし現在の小川卵培地による検査ではそれを実現することは不可能である。先進工業国の中で初代分離に卵培地のみを使用している国は日本だけである。液体培地の有効性は日本国内でも多くの研究者により証明されている。液体培地の導入は初代分離のみに留まらず、鑑別や感受性試験の時間の短縮にもつながり、早急の導入が望まれる。他方液体培地の有効性は認めているにもかかわらず高価であることから日常の検査への導入を控えているのも事実であろう。厚生省による新しい保険点数の査定を希望するものである。

遺伝子の持つ特異性と遺伝子を用いた検査の特異

性とは異なるものである。特に核酸増幅法は高感度であるがゆえに偽陽性の心配も必要である。核酸増幅法は塗抹や培養試験と同等の補助手段の一つと考え用いるべきであり、診断は臨床症状なども含め総合的に下されるものであろう。

参 考 文 献

- 阿部千代治：結核症の迅速診断。結核，72：659-672，1997。
- 阿部千代治：酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌培養システムの検討。感染症誌，70：360-365，1996。
- 斉藤肇ほか：MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での共同研究。臨床と微生物，24：897-903，1997。
- Abe, C. et al.: Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol, 30: 878-881, 1992.
- 阿部千代治ほか：酸化還元インジケーターを用いた抗酸菌迅速培養システム MB Redox の評価。結核，74：707-713，1999。
- 斎藤宏ほか：全自動抗酸菌培養システム，MB/BacT (Organon Teknika) の評価—第2報。結核，74：280，1999。
- Abe, C. et al.: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol, 37: 3693-3697, 1999.
- Abe, C. et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol, 31: 3270-3274, 1993.
- 青木正和ほか：PCR法を利用した抗酸菌DNA検出キット(アンプリコア™マイコバクテリウム)による臨床検体からの抗酸菌迅速検出。結核，69：593-605，1994。
- Ichiyama, S. et al.: Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (Amplicor Mycobacterium) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol, 34: 130-133, 1996.
- 古賀宏延ほか：Ligase Chain Reaction (LCR)法を用いた結核菌群DNA検出試薬の臨床的検討。感染症誌，71：1246-1251，1997。
- 阿部千代治ほか：結核菌の迅速検出のためのMTDの評価に関する共同研究。結核，70：467-472，1993。
- 阿部千代治ほか：アンプリコア・マイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究。結核，72：181-186，1997。
- Snider, D.E. and Roper, W.L.: The new tuberculosis. N Engl J Med, 326: 703-705, 1992.
- 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会：結核菌の薬剤感受性試験，特に試験濃度改変と比率法導入への提案。結核，72：597-598，1997。
- Canetti, G. et al.: Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO, 29: 565-578, 1963.
- Kiehn, T.E. et al.: Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*: tentative standard. NCCLS M-24T, 15: 1-31, 1995.
- Pease, A.C. et al.: Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 5022-5026, 1994.
- Hirano, K. et al.: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol, 37: 2663-2666, 1999.
- Tenover, F.C. et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol, 31: 767-770, 1993.

新結核菌検査指針について

A New Guide for the Laboratory Diagnosis of Mycobacterioses

あ べ ちよじ
阿 部 千代治
Chiyoji ABE

要 旨

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会により結核菌検査指針の改定作業が進められ、2000年5月に改訂版が出版された。検査法の大幅な変更に加え、検体の品質評価、液体培地の導入、核酸の相同性による抗酸菌菌種の鑑別・同定、核酸増幅法による診断、検査の精度管理などの新しい項目が新結核菌検査指針に含まれた。改定の理由と変更内容の紹介に加え、新しい検査法と従来の検査法をどのように組み合わせ使用すべきかについても触れた。

はじめに

結核菌検査指針は1950年に第一版が刊行されて以来、技術の進歩と検査業務の増加に応じて改定が繰り返されてきた。最後の改定後20年が経過し、その間に検査法に大きな進歩がみられた。結核菌の分離培養への液体培地の導入、核酸の相同性を利用した分離抗酸菌の鑑別・同定や患者材料から直接結核菌の遺伝子を検出する核酸増幅法などは既に多くの施設で日常検査に採り入れられている。また薬剤感受性試験法についても、これまでの絶対濃度法から比率法への変更が日本結核病学会から提案された。このように新しい検査法の導入や検査法の変更などがあり、実際の検査にそぐわない点が多々出てきたことから結核菌検査指針の改定を望む意見が出てきた。この要望を受けて日本結核病学会では抗酸菌検査法検討委員会で改定作業を進めた。委員会の中にワーキンググループを作り、1年以上にわたり時間をか

けて十分に議論を繰り返し、さらに抗酸菌検査法検討委員会の委員の間で検討を加え、抗酸菌検査法検討委員会編として2000年5月に結核予防会から出版された。新しい検査法の導入に加え大幅な検査法の変更があることから頭に新と付け、「新結核菌検査指針」として出版された。

I. 安全管理

結核菌の感染は、結核菌を排菌している患者が咳をしたときなどに飛散した飛沫の中に含まれている結核菌を吸入して起こる。排出された飛沫の水分は蒸発し、その中の結核菌を含む核は軽くなり長時間空気中に浮遊し感染源となる。

結核菌検査にはエロゾール発生の頻度の高い操作が多いこともあり、濃厚な検査材料を毎日取り扱う検査技師の結核発病率は、一般の人より数倍高いことが報告されている。結核菌を扱う操作は、レベル2以上の施設で安全キャビネット内で行う必要がある。新検査指針では、塗抹および培養検査の前処理として均等化・集菌法を推奨している。遠心濃縮はエロゾール発生の高い操作であり、バイオハザード対策を施した遠心機を備えるべきである。新検査指針では検査技師の定期検診についても触れている。また検査室の安全対策について、米国のマニュアルを参考にして記述されている。

II. 検査材料

患者から採取した喀痰が適切かどうかは検査の精度を保持するうえで重要である。担当の医師は、直

接確認し、不適切であれば再度患者に提出してもらう必要がある。日常の外来診察中にすべての患者材料の品質を確認することが不可能であれば、検査室からの報告を参考にする。したがって、検査技師が塗抹染色の結果を担当の医師に報告する際に塗抹鏡検の結果に加えて喀痰材料の性状も付記すべきである。

医師は時間のあるときに検査室にどのような性状の喀痰が出されているかチェックする必要がある。このことは、患者への痰の喀出指導にも役立つと考える。喀痰の肉眼的品質評価について指針の中で触れている。幼児や高齢者など喀痰の排出が困難な場合に胃液の検査をする。

III. 検査の頻度

診断時に連続3日間喀痰を採取し、塗抹および培養検査を行う。3回の塗抹検査が陰性の場合に、塗抹および培養検査を行った日とは別の日に気管支鏡を用いた検査を行うことができる。また3回の塗抹検査および培養検査に加え、診断時に核酸増幅法を1回行うことができる。これらは保険診療で認められている。

IV. 塗抹検査

これまでわが国では喀痰の一部を採取し直接スライドガラスに塗抹する直接塗抹法が採られていた。しかし菌が患者材料の中に均一に分布しているわけではなく、採取部位により異なる結果が得られることが知られている。検査の精度を保つために均等化・集菌材料を塗抹検査に供する。この種の前処理は米国の胸部学会（ATS）でも勧めていることであり、「新結核菌検査指針」でも推奨している。ただし外来患者で検査の結果を急ぐ場合は直接塗抹で検査する

ことになると思われるが、その場合にも均等化・集菌材料から塗抹標本を作製し、結果の確認をする必要がある。

抗酸菌の染色に Ziehl-Neelsen (Z-N) 法と蛍光法が用いられている。材料中に菌が少ない場合に Z-N 法では見落とす場合がある。これに対し、蛍光法では、抗酸菌が暗い視野の中にオレンジ色に光って見えることから見落としが少ないこと、Z-N 法では 1,000 倍拡大での観察に対し、蛍光法では 200 倍拡大で観察するので観察に要する時間も短縮できることから蛍光法の使用を勧める。ただし、蛍光法では糸屑などが光って見えることもあるので、菌数が僅かな材料（数視野に1個位）は Z-N 法で確認する必要がある。この場合、蛍光染色標本を Z-N 染色可能であり、陽性個所をマークしておけば確認が容易である。

これまで塗抹検査の結果をガフキー号数で表示していた。しかし標本中の菌数は材料の採取部位や塗抹の厚薄により変動するので、細かく分けても意味がない。また多くの場合、材料中に数個ないし数十個の菌が固まってみられる。「新結核菌検査指針」では、ガフキー号数での表示をやめ検出菌数を 1+, 2+, 3+ で表すことにした（表1）。この表示は諸外国でも用いられている。問題は、定期外健康診断のガイドラインの中で重要度の算定にガフキー号数を用いている²⁾ことであったが、この場合、1+はガフキー2号、2+は5号、3+は9号と読み替えて算定に用いることで対策のうえで想定された問題は解消する。これまでガフキー1号と表示していた例は±と記述し、同一の材料から塗抹標本を作り直すか、可能なら別の材料で再検査することにした。

V. 培養検査

前処理の目的は検査材料を消化・均等化し、含ま

表1 鏡検における検出菌数記載法

記載法	蛍光法 (200倍)	Ziehl-Neelsen 法 (1,000倍)	備考* (ガフキー号数)
—	0 / 30視野	0 / 300視野	G0
±	1 ~ 2 / 30視野	1 ~ 2 / 300視野	G1
1+	2 ~ 20 / 10視野	1 ~ 9 / 100視野	G2
2+	≥20 / 10視野	≥10 / 100視野	G5
3+	≥100 / 1視野	≥10 / 1視野	G9

*相当するガフキー号数

れる雑菌を殺し、抗酸菌のみを選択的に培養することにある。そのためには検体に適した前処理法を選ぶことが重要である。非結核性抗酸菌、特に *Mycobacterium fortuitum* や *Mycobacterium chelonae* などの迅速発育菌は結核菌よりもアルカリに対する抵抗性が弱く、その前処理後のコロニー形成単位に減少がみられる。したがって抗酸菌の分離に当たっては、粘液溶解剤を加えることにより、水酸化ナトリウムの濃度をできるだけ低く抑えることが重要である。

粘液溶解作用を持つ N-アセチル-L-システイン (NALC) を用いた NALC-NaOH 法は、前処理剤による消化均等化と遠心による集菌を組み合わせ、アルカリの影響を極端に少なくした方法である³⁾。この種の前処理は液体培地へ接種する場合には必須であり、卵培地に接種した場合も検出率は高まる。NALC-NaOH 法は諸外国でも用いられており、新検査指針で喀痰などの粘液検体の前処理法として勧められている。この NALC-NaOH 処理検体は培養のみならず塗抹検査および核酸増幅法に用いられる。

1993年に米国の CDC は結核菌の分離および鑑別・同定の結果を 10~14 日以内に、薬剤感受性試験の結果を 30 日以内に担当医に報告するよう勧告したり。患者材料からの抗酸菌の分離結果の報告までに要する時間の短縮は適切な治療を行ううえで重要である。わが国では、卵培地を使用していることから上の勧告を満足させることは不可能であり、液体培地の導入は必須である。液体培地の有用性は多くの人が認めている (表 2)。一方卵培地で分離できても液体培地で分離できない抗酸菌の存在も報告されている。

新検査指針では、初回分離に液体培地と卵培地を 1 本ずつ用いることを勧めている。検査室の受容力や液体培地の価格の問題などがあり、3 回の培養に液体培地と卵培地を 1 本ずつ用いることが不可能な病院も出てこよう。液体培地の導入について施設内

で検討する必要がある。例えば、① 3 回とも両者、② 2 回を両者 + 1 回卵培地、③ 1 回両者 + 2 回卵培地、④ 2 回液体培地 + 1 回卵培地、など検討する。病院によっては、卵培地での培養をやめ、液体培地のみを使用することを考えているところもあると聞いている。しかし液体培地でのみの培養では、菌数が測定できないために非結核性抗酸菌症の診断に不都合が生じること、また結核菌と非結核性抗酸菌の両者が同時に検出される場合があり、結核菌に対する薬剤感受性を誤って判定する場合があることなど問題が残る。

これまで入院患者の退院の時期は塗抹検査と小川培地による培養検査の結果により判定されており、問題は生じていないことから治療中の患者の培養検査に液体培地を用いる意義は低い。治療中の患者の定期培養検査は小川培地のみでよい。ただし塗抹陽性が続いているにもかかわらず、小川培地で結核菌が分離できない場合は液体培地による培養も加える。それは、耐性菌の中には液体培地で分離できても卵培地で発育し難い菌が存在するからである。

VI. 分離抗酸菌の鑑別・同定

これまで抗酸菌の同定は主として培養および生化学的性状に基づいてなされてきており、検査が煩雑でしかも多くの時間を要していた。近年分子遺伝学が進歩し、抗酸菌菌種の同定に核酸の相同性や核酸増幅法を利用した迅速検査法が開発され、既に日常検査に用いられている。遺伝子を用いた検査は感度や特異性の点で優れた方法であるが、同定上有用な培養・生化学的性状検査と併せて行い、それらの結果を総合的に判断することが重要である。

新検査指針では、核酸の相同性を利用したキットの使用を勧めている。すなわち、アキュプロープ結核菌群および *Mycobacterium avium* complex キット

表 2 種々の培地による 587 喀痰材料からの抗酸菌の分離

分離菌 (n)	分離株数 (%)					
	MB Redox	MGIT	2%小川	MB Redox + 2%小川	MGIT + 2%小川	MB Redox + MGIT
結核菌 (133)	115 (86.5)	122 (91.7)	87 (65.4)	124 (93.2)	128 (96.2)	129 (97.0)
MOTT (70)	62 (88.6)	63 (90.0)	46 (65.7)	66 (94.3)	64 (91.4)	69 (98.6)
合計 (203)	177 (87.2)	185 (91.1)	133 (65.6)	190 (93.6)	192 (94.6)	198 (97.5)

MOTT: 非結核性抗酸菌

トの感度と特異性は100%であることから、最初にこれら2種により順次鑑別を行い、陰性例についてはDDH マイコバクテリアキットと培養および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。

早急に検査の結果を得るために、液体培養で陽性を示した時点で培養の一部を採取し核酸増幅法を行っている施設があると聞いているが、時間的にも検査の信頼性の点からもアキュプローブを用いた検査が優れている。

VII. 核酸増幅法

米国の食品医薬品局 (FDA) は核酸増幅法の承認の際 (1995 年) に塗抹陰性例の感度が低いことからその適応を塗抹陽性例に限定した。その後、用いる検体の量を増やした改良型が Gen-Probe 社から発売され、米国を中心とした評価研究で塗抹陰性例でも高い感度と特異性 (陰性一致率) がみられた⁵⁾ ことから、FDA (1999 年) は改良型 MTD を塗抹陰性例からの結核菌の検出および結核症を否定するための検査にも拡大することを承認した。

わが国では、1994 年に厚生省の認可が得られ、現在3社からキットが発売されている。臨床でのキットの利用について、日本結核病学会の予防・治療合同委員会から1995年に勧告文⁶⁾が出されているが、使い方は病院によりまちまちであり、保険審査にも混乱が生じているのが現状である。

初回診断時の3日間の塗抹および培養検査に加え、1回核酸増幅法による検査を行うことができる。1人の患者で材料をかえて複数回行った場合でも保険点数の請求は1回分である。それでは初回診断時に1回認められている検査をどのように利用すべきか、①塗抹陽性・陰性の別なく結核を疑った全例に核酸増幅法を積極的に行うことを勧めるのか、②対策にかかわる塗抹陽性例に積極的に行うのか、あるいは③担当医の判断で行うのか、この検査は価格の高い検査であることから今後十分に議論する必要がある。

治療中の患者の follow-up にも積極的に使い、入院患者の退院時期の判断に役立てたいとする意見もある。しかし、前記の予防・治療合同委員会勧告で

も治療中の患者の定期検査に使用すべきでないとしており、保険点数の請求もできない。入院患者の退院の目安は施設により異なり、多くの場合塗抹検査と小川培地による培養検査で判断されており、現在のところ問題は生じていない。しかし退院の時期は担当医の判断で行うことができるといっても、結核専門医が今後少なくなることが予想されることから、判断の目安を学会で作る必要がある。

核酸増幅法で結核菌群が陰性の場合には、塗抹陽性・塗抹陰性の別なく機械的に *M. avium* または *M. intracellulare* 試験が多くの施設で行われている。非結核性抗酸菌症の診断基準との関連を考えたときどのような使いかかについても学会で検討する必要がある。

偽陽性および偽陰性の結果が学会で報告されている。検査室の施設と設備、核酸増幅法の臨床的位置づけ、市販されているキットの有用性の比較などが新検査指針の中で触れられている。

VIII. 薬剤感受性試験

従来からの小川培地を用いる薬剤感受性試験について、用いている薬剤の試験濃度や判定方法について結核専門医の間に検討を望む意見が以前からあった。また結核療法研究協議会が行ったアンケート調査で、試験の結果が臨床で適切に応用されていない例もあることが判明した。日本結核病学会では、1996年に薬剤耐性検査検討委員会を設置し検討を重ね、1997年に小川培地を用いる比率法を新しい薬剤感受性試験法として提案した⁷⁾。従来法との違いは試験濃度を1濃度にしたこと、基準濃度を変えたこと、絶対濃度法を比率法に変えたことである。また判定について、耐性菌の割合が1%以上になれば1~2カ月以内に大多数が耐性菌で占められるようになるという考えから耐性菌の割合が1%未満を感受性、1%以上を耐性と判定することにした (表3)。提案された新しい検査法は、用いる培地は異なるが諸外国で採用している方法と同様であり、得られた結果は相互に比較可能である。1999年に厚生省は結核医療の基準の一部改定を行い、その中で日本結核病学会から提案された比率法を新しい検査法として取り上げた。この考えに基づいた薬剤感受性試験培地は既に市販されており、使用可能である。