

外の検体も含む) となった全症例を対象とする。

#### 調査個人票

上記対象患者から分離された結核菌について薬剤感受性試験の結果が判明次第、個人調査票にその成績と臨床データ等必要事項を記入する。上記の初代分離株、または感受性試験の対照培地に発育した結核菌を結核研究所での検査のために送付する。非結核抗酸菌について薬剤感受性検査は不要であるが、分離同定された時点で結核研究所での検査のために送付する。非結核性抗酸菌はその概数を知ることと同定検査が誤っている場合があったので本研究では非結核性抗酸菌も含めることとする。

#### 菌株と調査票の送付

上記の菌株(1本)と調査個人票を一組にして結核研究所宛てに送付する。菌株は培養期間が短いことが望ましいので、概ね1ヶ月分をまとめて送付する。

#### 薬剤感受性試験

送付された菌株に関して、1%小川培地を用いた標準法により、INH、RFP、SMおよびEBについて薬剤感受性試験を実施する。

#### データの解析

薬剤感受性試験結果(感受性/耐性)について、年齢、性別、治療経過、合併症等との関連について解析を実施する。

#### 期待される結果

日本でも現在までに4剤併用短期化学療法を用いたDOTS療法が拡大しつつあり、今回は前回よりも耐性菌の分離頻度が減少している事が期待される。また、特に液体培地の導入により非結核抗酸菌の分離率が上昇していることも予想される。

#### 倫理面への配慮

参加を拒否する患者についてはこれを強要することはない。また、参加を拒否することによる何らの診療上の不利益を被ることもないよう参加施設には十分な注意を払うよう要請する。

個人調査票から得られる個人情報および各検体から得られる薬剤感受性検査の情報は結核療法研究協議会および結核研究所内の担当者のみがこれを知りうるものとし、情報・検体については結核研究所内で当該目的以外に使用しないものとする。データの発表に際しては個人を特定出来ない様に細心の注意を払うものとする。

#### <研究協力者>

御手洗聡・大友幸二・平野和重：結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

和田雅子：結核予防会結核研究所研究部主幹

#### C. 研究結果

表1のように全国の協力施設より4,647件の参加検体登録があった。結果的に薬剤感受性試験を実施しえた結核菌株は3,125件(表2)であり、うち3例については患者情報が不十分であったことから解析からは除外した。対象患者は表3のごとく男性2,211名、女性911名でそれぞれの平均年齢は $61.1 \pm 18.5$ (0-100)および $61.0 \pm 22.4$ (0-100)であった。また外国籍の患者が93名含まれていた。年齢分布は図1の通りである。表4に対象患者職業を示したが、対象に高齢者が多い事を反映して無職が約半数を占めていた。また、各施設における患者診断をみると、肺結核のみ2,704例で、その他肺外結核との合併が325例、肺外結核のみ93例であった。合併症についてみると、糖尿病の合併が15.9%と最も多かった(表6)。

各施設で実施されていた薬剤感受性試験方法についてみると、ビットスペクトル-SRおよびウエルパックSで全体の2/3を占め

ていた。

薬剤感受性試験結果（表 8）についてみると、各薬剤への耐性率（Any: その他の薬剤への耐性は考慮せず、当該薬剤の耐性がある場合）は初回あるいは治療 4 週以内の患者で、INH 2.8%、RFP 1.0%、SM 7.0%、EB 1.2%となった。また、既治療患者群では同様に INH 18.9%、RFP 11.0%、SM 14.4%、EB 10.1%となった。初回治療および既治療での耐性率は統計的に有意な差を認めた ( $p < 0.0001$ )。さらに多剤耐性菌は 60 株認められ、初回治療 0.7%、既治療 9.8%となった。既治療患者に関してはさらに再発再治療群と脱落後再治療群に分類しており、表 9 および表 10 のような結果を得た。

#### D. 考察

今回の結核薬剤耐性サーベイランスにより、2002 年時点での日本での主要抗結核薬（INH、RFP、SM、EB）の耐性率が明らかとなった。前回 1997 年の調査より薬剤感受性試験法として比率法を導入しており、今回のサーベイランスは比率法による調査として二回目となり、耐性の動向が初めて明確となった。1997 年の結果と比較すると、初回規治療患者での EB 耐性を除いて、初回・既治療ともに耐性率が低下していた。また、多剤耐性菌については 0.7%と前回 0.8%とほぼ同率であり、多剤耐性患者の問題が有効に解決されていないことを示していると思われた。

年齢階級別にみると、20～40 歳代に耐性率が高く、年齢が高くなるに従って耐性率は低下していた。これは、初回治療での耐性率が全年齢でほぼ同等であることから考えると、この年代での治療が有効に行われていない事を示していると思われた。1997 年から 2002 年までの間に結核緊急事態宣言などがあり、治療・対策が進められているが、さらに徹底した対策が必要と考えられる。

#### E. 結論

QFT-2G 検査の適切な実施時期については、現行の定期外検診と同様に患者登録後 2 ヶ月後で概ね妥当と考えられるが、個人によっては 2 ヶ月後以降に陽性になる事例もあるため、接触者について患者登録後 2 ヶ月後の定期外健診以降にも定期的に QFT-2G 検査による追跡をする方法が考えられる。新生児・幼児に対する QFT-2G 検査の適応については、来年度に現行の半分量の血液を用いた系で検討する。QFT-2G 偽陰性者については、ELISPOT 法により検出できる可能性が示唆された。QFT-2G と ELISPOT の感度に関しては、来年度により規模の大きい研究が望まれる。化学治療および予防内服が QFT-2G 検査に及ぼす影響としては、処置後全体的に反応が低下することが見られた。しかし、処置終了直後では依然として高率で QFT-2G 陽性者が存在するため、今後長期的なフォローが望まれる。

#### F. 健康危機情報

とくになし。

#### G. 研究発表

準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 参加施設名および個人票登録数一覧

施設名	検体	施設名	検体
愛媛県立新居浜病院	8	国立療養所西新潟中央病院	95
愛媛県立中央病院	12	国立療養所西鳥取病院	24
愛北病院	7	国立療養所西奈良病院	51
医学振興財団川崎病院	3	国立療養所西別府病院	105
医療法人西福岡病院	34	国立療養所千葉東病院	119
横須賀共済病院	30	国立療養所川棚病院	9
恩賜財団済生会明和病院	39	国立療養所大牟田病院	67
岩見沢労災病院	51	国立療養所天竜病院	52
岩手県立中央病院	16	国立療養所東宇都宮病院	71
久留米大学病院	7	国立療養所東京病院	181
京阪奈病院	38	国立療養所東佐賀病院	34
京都市民病院	32	国立療養所東埼玉病院	195
金沢市立病院	12	国立療養所東徳島病院	46
九州大学医学部附属病院	1	国立療養所東名古屋病院	158
慶応義塾大学病院	41	国立療養所道北病院	53
結核予防会新山手病院	10	国立療養所南横浜病院	203
結核予防会大阪府支部大阪病院	36	国立療養所南岡山病院	75
結核予防会複十字病院	147	国立療養所南九州病院	25
健康保険岡谷塩嶺病院	13	国立療養所南福岡病院	32
県立愛知病院	46	国立療養所富山病院	6
県立安芸病院	5	国立療養所福岡東病院	18
呉共済病院	22	国立療養所兵庫中央病院	4
公立陶生病院	19	国立療養所鈴鹿病院	15
国民健康保険野上厚生総合病院	7	国立療養所和歌山病院	39
国立国際医療センター	123	砂川市立病院	9
国立函館病院	16	財団法人鹿島病院	15
国立療養所愛媛病院	23	市立秋田総合病院	30
国立療養所沖縄病院	31	市立福知山市民病院	13
国立療養所宮城病院	12	鹿児島県立薩南病院	16
国立療養所近畿中央病院	487	織本病院	1
国立療養所熊本南病院	21	神奈川県立循環器呼吸器病センター	69
国立療養所広島病院	69	清瀬上宮病院	16
国立療養所高松病院	46	聖心会高岡病院	19
国立療養所再春荘病院	18	聖隷三方原病院	22
国立療養所札幌南病院	79	西神戸医療センター	105
国立療養所山形病院	62	青森県立中央病院	17
国立療養所山陽病院	31	静岡県立総合病院	69
国立療養所松江病院	49	仙台赤十字病院	5

国立療養所神奈川病院	91	川崎医科大学附属病院	12
国立療養所晴嵐荘病院	4	足利赤十字病院	5
国立療養所西群馬病院	23	太田西ノ内病院	6
国立療養所西甲府病院	32	大阪府立羽曳野病院	234
大同病院	11	八代市立病院	2
中部労災病院	18	福岡県立遠賀病院	22
長崎市立病院成人病センター	38	福岡県立嘉穂病院	27
長崎大学医学部附属病院	5	福島県立医科大学医学部附属病院	12
土岐市立総合病院	11	平鹿総合病院	14
東京慈恵会医科大学第三病院呼吸	37	北海道社会保険病院	92
東京都立清瀬小児病院	3	北九州市立門司病院	63
東京都立府中病院	99	総計	4647

表2 送付検体内訳

	対象+対象外	%	対象のみ	%
結核	3,125	67.2	3,125	75.6
非結核性抗酸菌	901	19.4	901	21.8
混在	26	0.6	26	0.6
雑菌汚染	82	1.8	82	2.0
菌株無し	84	1.8		
発育無し	164	3.5		
検体重複	25	0.5		
外来患者	16	0.3		
対象期間外	224	4.8		
総計	4,647		4,134	

表3 患者背景（結核のみ 3,122 例：3 例は治療情報不十分のため除外済）

患者数		年齢（範囲）	国籍	男性	女性	総計
男性	2,211	61.1±18.5 (0~100)	日本	2,161	864	3,025
女性	911	61.0±22.4 (0~100)	在日外国人 5 年以 上	24	8	32
総数	3,122	61.1±19.8 (0~100)	在日外国人 5 年未 満	18	24	42
			在日外国人期間不 明	7	12	19
			不明	1	3	4

図1 対象患者年齢分布

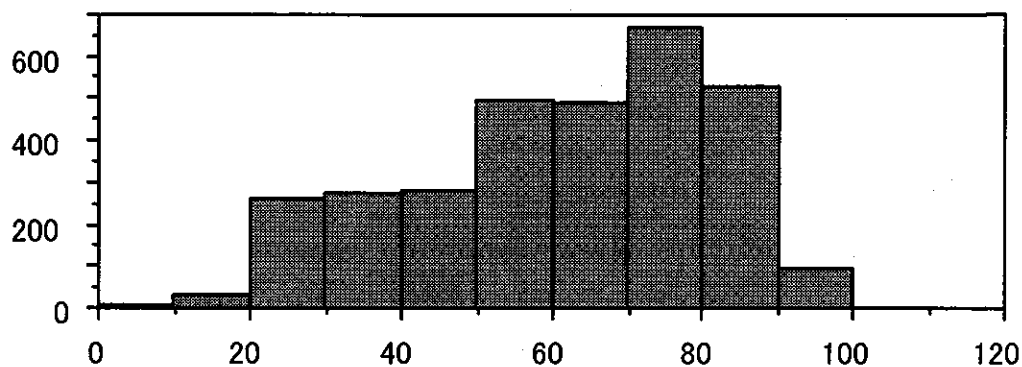


表4 対象患者職業

職業	男性	女性	総計
常備勤務	668	129	797
臨時雇用	125	37	162
自営	209	29	238
家事従事	3	209	212
無職	1155	469	1624
その他	51	38	89

表5 対象患者の臨床診断

診断	症例数
肺結核のみ	2,704
結核性胸膜炎のみ	35
肺外結核（胸膜炎除く）のみ	55
肺結核＋結核性胸膜炎	200
肺結核＋結核性胸膜炎＋肺外結核	13
肺結核＋肺外結核（胸膜炎除く）	112
結核性胸膜炎＋肺外結核（胸膜炎以外）	3

表6 対象患者合併症

合併症	なし	糖尿病	悪性腫瘍	ステロイド	胃潰瘍	HIV	塵肺	腎透析	肝炎	アルコール依存
例数	1518	497	199	88	96	9	28	15	154	74
%	48.6	15.9	6.4	2.8	3.1	0.3	0.9	0.5	4.9	2.4

表7 感受性試験検査方法

感受性試験法	使用例数 (%)
普通法	409 (13.1)
ビットスペクトル-SR	1090 (34.9)
ウエルパック S	1040 (33.3)
MGIT	264 (8.5)
その他	253 (8.1)
不明・未実施	66 (2.1)
総計	3122

表8 薬剤感受性結果 臨床データとのリンクによる解析 3,122 株 (3 例情報不足)

		INH 0.2	INH 1.0	RFP	SM	EB
Any	<b>Combined</b>					
	Resistant	156	106	74	248	74
	Susceptible	2966	3016	3048	2874	3048
	Proportion	5.0%	3.4%	2.4%	7.9%	2.4%
	<b>New</b>					
	Resistant	77	53	28	188	32
	Susceptible	2628	2652	2677	2517	2673
	Proportion	2.8%	2.0%	1.0%	7.0%	1.2%
	<b>Previously treated</b>					
	Resistant	79	53	46	60	42
	Susceptible	338	364	371	357	375
	Proportion	18.9%	12.7%	11.0%	14.4%	10.1%
Mono	<b>Combined</b>					
	Resistant	59	36	7	164	8
	Susceptible	3063	3086	3115	2958	3114
	Proportion	1.9%	1.2%	0.2%	5.3%	0.3%
	<b>New</b>					
	Resistant	33	21	5	144	6
	Susceptible	2672	2684	2700	2561	2699
	Proportion	1.2%	0.8%	0.2%	5.3%	0.2%
	<b>Previously treated</b>					
	Resistant	26	15	2	20	2
	Susceptible	391	402	415	397	415
	Proportion	6.2%	3.6%	0.5%	4.8%	0.5%

New と Previously treated の間で  $p < 0.0001$  の有意差あり (全薬剤)

表9 再発再治療 (化学療法を指示にて終了) 患者のみ 312 株

		INH 0.2	INH 1.0	RFP	SM	EB
Any	Resistant	54	37	28	38	26
	Susceptible	258	275	284	274	286
	Proportion	17.3%	11.9%	9.0%	12.2%	8.3%
Mono	Resistant	21	11	2	13	2
	Susceptible	291	301	310	299	310
	Proportion	6.7%	3.5%	0.6%	4.2%	0.6%

表 10 脱落後再治療（自己中断）患者のみ 59 株

	INH 0.2	INH 1.0	RFP	SM	EB
<b>Any</b>					
Resistant	12	7	9	13	9
Susceptible	47	52	50	46	50
Proportion	20.3%	11.9%	15.3%	22.0%	15.3%
<b>Mono</b>					
Resistant	3	2	0	4	0
Susceptible	56	57	59	55	59
Proportion	5.1%	3.4%	0%	6.8%	0%

再発再治療と脱落後再治療で有意差無し



表 11 年齢階級別薬剤耐性 (その 1)

Age	No. of samples	Category	Result	INH	RFP	SM	EB
19<	34	New	Resistant	0	0	1	0
			Susceptible	34	34	33	34
			Proportion	0.0%	0.0%	2.9%	0.0%
		Pre-treat	Resistant	0	0	0	0
			Susceptible	0	0	0	0
			Proportion	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
20-29	258	New	Resistant	11	4	23	4
			Susceptible	230	237	218	237
			Proportion	4.6%	1.7%	9.5%	1.7%
		Pre-treat	Resistant	7	4	6	5
			Susceptible	10	13	11	12
			Proportion	41.2%	23.5%	35.3%	29.4%
30-39	273	New	Resistant	10	4	22	2
			Susceptible	235	241	223	243
			Proportion	4.1%	1.6%	9.0%	0.8%
		Pre-treat	Resistant	8	9	7	7
			Susceptible	20	19	21	21
			Proportion	28.6%	32.1%	25.0%	25.0%
40-49	278	New	Resistant	10	4	23	4
			Susceptible	232	238	219	238
			Proportion	4.1%	1.7%	9.5%	1.7%
		Pre-treat	Resistant	13	10	8	5
			Susceptible	23	26	28	31
			Proportion	36.1%	27.8%	22.2%	13.9%
50-59	497	New	Resistant	13	3	37	3
			Susceptible	408	418	384	418
			Proportion	3.1%	0.7%	8.8%	0.7%
		Pre-treat	Resistant	16	12	11	11
			Susceptible	60	64	65	65
			Proportion	21.1%	15.8%	14.5%	14.5%

表 11 年齢階級別薬剤耐性 (その 2)

Age	No. of samples	Category	Result	INH	RFP	SM	EB
60-69	488	New	Resistant	7	2	33	4
			Susceptible	398	403	372	401
			Proportion	1.7%	0.5%	8.1%	1.0%
		Pre-treat	Resistant	15	7	16	9
			Susceptible	68	76	67	74
			Proportion	18.1%	8.4%	19.3%	10.8%
70-79	666	New	Resistant	14	7	31	9
			Susceptible	554	561	537	559
			Proportion	2.5%	1.2%	5.5%	1.6%
		Pre-treat	Resistant	14	3	7	4
			Susceptible	84	95	91	94
			Proportion	14.3%	3.1%	7.1%	4.1%
80-89	530	New	Resistant	10	2	16	3
			Susceptible	453	461	447	460
			Proportion	2.2%	0.4%	3.5%	0.6%
		Pre-treat	Resistant	5	0	3	0
			Susceptible	62	67	64	67
			Proportion	7.5%	0.0%	4.5%	0.0%
90<	98	New	Resistant	2	2	2	3
			Susceptible	84	84	84	83
			Proportion	2.3%	2.3%	2.3%	3.5%
		Pre-treat	Resistant	1	1	2	1
			Susceptible	11	11	10	11
			Proportion	8.3%	8.3%	16.7%	8.3%

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

結核菌検査とくに薬剤感受性検査の信頼性に関する研究

分担研究者 御手洗 聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター  
細菌検査科 科長

研究要旨

結核の診断や治療において抗酸菌検査が重要である事は医療従事者においてよく認識されており、世界的にも結核対策プログラムと検査室機能の統合が進められている。しかしながら本邦での検査精度管理については実践的活動は皆無に等しい。そこで、最も臨床的に問題の大きいと思われる薬剤感受性検査を中心として精度管理活動を行った。

抗結核薬薬剤感受性試験外部精度アセスメントでは、平成 15 年度に実施したアンケート調査結果から薬剤感受性試験実施件数の多い病院検査室および検査センター上位 53 施設に対して薬剤感受性試験パネルテストを実施した。平均として Isoniazid (INH) および Rifampicin (RFP) の結果は感度・特異度共にほぼ信頼できるものの、精度の低い施設も認められた。また 15 年度特に精度に問題のあった 2 施設については現地で改善活動を行い、試験内容の改善をみた。実践性としては、検体送付方法および現地での改善活動に多大な労力が必要であり、規模を拡大するためにはこれを専門的に実施する機関が必要と考えられた。

外部精度アセスメント用人工喀痰作製に関する研究では、H37Ra 等の弱毒菌、培養細胞および別個に調整した合成基質を混合し、塗抹標本を作製した。従来法による標本は肉眼・顕微鏡所見が実際の喀痰標本と大きく異なっていたが、今回の人工喀痰は種々の点で実際の喀痰と同等であった。培養弱毒抗酸菌を用いるため陽性度の設定が容易で再現性も高く、バイオハザード上の問題もなく、優れたスライド作製法と考えられる。

薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法の INH 基準濃度判定の差違に関する研究では、INH の薬剤感受性試験において液体培地 (MGIT) と固体培地による検査結果に差違が見られた結核菌株 23 株について VNTR-MIRU にて検討したが、特定の菌による集団感染を示唆する結果は得られなかった。現在日本ベクトン・ディッキンソンと共同で全国的にどの程度 MGIT 耐性・標準法感受性株が存在するか調査中であり、結果により薬剤感受性試験の方法の改善の必要性を評価する予定である。小児結核の予防と早期診断に大きな意義を持つ結核感染の正確な診断のために、ツベルクリン反応に代わる技術の開発が希求されてきた。

A. 研究目的

結核は未だ単体の病原菌としては日本最大の伝染病である。結核の診断においては細菌学的検査が所謂ゴールドスタンダードであるが、その検査精度に関する調査・研究はほとんどない。オーダーメイド医療が重要となる今日、基本的な検査から高度な技

術を要するものに至るまで検査の信頼性を確保する事は極めて重要である。

本研究では平成 15 年度に主要な検査センターに対する結核菌薬剤感受性試験の外部精度アセスメント、検査および精度管理に関するアンケート調査等を実施し、検査精度のばらつきや精度管理活動の不備を明

らかにした。

今年度は、薬剤感受性試験外部精度アセスメントの拡大と現地での評価・改善活動を行うと共に、昨年度困難であった塗抹検査外部精度アセスメントツールの開発を行う事とした。また、薬剤感受性試験における問題点の一つである液体培地と固体培地による感受性試験の結果の差異について研究を継続する。

## B. 研究方法

以下1~3までの3つの課題を設定して研究を行った。

### 1) 検査センター及び病院検査室に対する薬剤感受性試験外部精度アセスメント

【目的】結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室を対象として、再現性や一致率を含む感受性試験の状況を評価・改善する事を目的とする。

#### 【方法】

参加施設：

平成15年度に実施した結核菌検査に関するアンケート調査から、結核菌薬剤感受性試験を実施している検査センター及び病院検査室の上位各30施設を対象として参加を依頼した。基本的には参加は任意であり、参加を諾とした施設のみに試験用の検体を送付する。検体の送付やデータの取りまとめは結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科にて行った。

送付検体（結核菌株）：

結核菌20株を輸送用小川培地上に発育した状態で送付した。今回送付した菌株はSupranational Reference Laboratory Network (SRLN)で毎年実施されている薬剤感受性試験外部精度保証プログラムに使用された菌株のうち、高い施設間一致が得られているものを選定して10組20株組み合わせて使用した。これらの株については、既にSRLNにて評価が定まっており、その最終的な評価を基準として感受性・耐性を判定した。結果として今回のパネルにおけるそ

れぞれの薬剤に対する耐性菌の割合は、INH、RFP、SMについて60%、EBについて40%となった。それぞれの施設に配付される検体には、一検体ずつ異なる番号を無作為に割り振り、全ての結果はこの番号によって解析した。当然ながら菌株の中には薬剤耐性株が含まれているため、取り扱いには十分なる注意を要することを明言している。

試験薬剤：

検査薬剤はIsoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM) およびEthambutol (EB)とした。

感受性試験方法：

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性試験を行った。調査用紙に感受性試験結果、菌液調製法を記載し、コーディネーター宛返送とした。

結果の評価：

それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定した。2000年の結核菌検査指針改訂により比率法が標準とされており、基本的に比率法が用いられると考えるが、絶対濃度法を用いている場合は「不完全耐性」も許容することとした。尚、報告用紙に記入する際は、感受性にはS、耐性にはR、不完全耐性にはIを用いて表記するとした。

結果の解析：

データについては「感度(sensitivity)」、「特異度(specificity)」、「耐性的中率(predictive value R)」、「感受性的中率(predictive value S)」、「一致率(efficiency)」および「再現性(reproducibility)」を計算して評価した。ここで「感度」とは真の耐性のうちどれだけを検出しえたか、「特異度」とは真の感受性のうちどれだけを検出しえたかを示す。また「一致率」とは全体のうち真の耐性および感受性株を検出できた正解率を示す。「再現性」は、試供菌に含まれる同一株について同一の判定を行う率を示している。

解析結果については最終的にそれぞれの

施設に通知することとした。発表および論文報告において施設名は匿名化し、個々の施設が特定されないよう配慮した。

経費：

本研究に関して参加検査センターから費用を徴収しない。ただし、検査センターでの供試菌株の薬剤感受性試験と結果の送付に掛かる費用は検査センターの負担とした。試供検体の処理：

試供検体については、今回の研究目的以外には使用せず、検査終了後に各施設にて滅菌し廃棄する事とした。

## 2) 喀痰塗抹検査パネルテスト標本の開発

【目的】抗酸菌喀痰塗抹検査の外部精度アセスメントでは一般的に日常検査されたスライドを無作為に再検査する方法（クロスチェック）が用いられているが、検査数が膨大になると中央での再検査は物理的に困難である。もう一つの方法として、薬剤感受性試験の場合と同様に結果既知の検体を送付して試験を行う方法（パネルテスト）があるが、抗酸菌塗抹検査ではこれまで適切な標本作製する方法がなく、事実上全く実施されていなかった。そこで適切なテストパネルを作製することを目的とした。

【方法】

これまでに報告されている方法は全て患者の喀痰を利用したものであり、現在容易に入手出来ないため人工喀痰を作製した。

細胞の調整：

THP-1 細胞を 10%FBS 加 RPMI1640 培地にて 10-14 日間 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養する。リン酸緩衝液にて 3 回洗浄後遠心し、上清をデカントで捨てた後ペレットを約 30 分間自然乾燥し、混合用の細胞とした。

抗酸菌の調整：

0.5% Tween80 を含む液体培地にて *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur あるいは *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を約 2 週間培養し、OD<sub>660</sub> = 0.2 以上になったところ

で孔径 5.0μm のフィルターで濾過を行い、混合用菌液とした。フィルター処理した菌液原液を 3+ のスメア用とし、この原液を 5 倍段階希釈し、2+, 1+, ± 用の菌液を作製した。

人工基質の調整と混合：

最終濃度 8% となるようにアクリルアミド、ビスアクリルアミド、TBE バッファー、過硫酸アンモニウム、滅菌蒸留水を混合し、細胞、抗酸菌液と良く攪拌した。その混合液を細胞ペレットに加えて良く混合し、TEMED を添加した（アクリルアミド濃度最終 4%）後、光源下で約 30 分間静置した。光重合によりポリアクリルアミドが形成され粘性が生じた時点で検体の一部をエーゼで取り、スライド上にスメアを作製した。

## 3) 薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法の INH 基準濃度判定の差違に関する研究

【目的】新しい感受性検査法、特に液体培地による迅速診断法と 1% 小川培地による標準法の差異について検討する。

【方法】結核予防会複十字病院において *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT; Becton Dickinson) による薬剤感受性試験を導入以降、INH、RFP、EB、SM のいずれかに耐性を示した臨床株 191 株を得ており、これらのうちで Isoniazid (INH) の薬剤感受性試験において 1% 小川培地を用いた標準法との間に結果の齟齬 (MGIT 0.1μg/ml 耐性・1% 小川培地標準法 0.2μg/ml 感受性) を示した 24 株について Variable Number Tandem Repeat (VNTR) - *Mycobacterium Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) による分子疫学的解析を実施した。

MIRU による疫学解析：

上記の 24 株の結核菌について小川培地上に発育したコロニーを約 5mg 掻き採り、TE バッファー 1ml に懸濁後 1.5ml のチューブ内で 100°C にて 10 分間煮沸処理した。室温で冷却後 11,000rpm にて 5 分間遠心し、

上清 500 $\mu$ l を別のチューブに移した。この検体に Phenol:Chroloform:Isoamylalcohol (25:24:1) 500 $\mu$ l を加え、良く混合した。15,000rpm にて5分間遠心し、水層を別のチューブへ移した。これに Chroloform:Isoamylalcohol (24:1) 500 $\mu$ l を加え、良く混合した後 15,000rpm にて5分間遠心し、水層を別のチューブへ移した。通常のエタノール沈殿にて核酸を分離し、15,000rpm で10分間遠心した後エタノールを捨て、70%エタノール 500 $\mu$ l にてペレットをリンスした後、自然乾燥させた。ペレットを 300 $\mu$ l の滅菌蒸留水にて溶解し、PCR 用の検体とした。

表1 MIRU 解析に用いたプライマー

Name	Sequences
MIRU2-F	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT
MIRU2-R	TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
MIRU4-F	GCGCGAGAGCCCGAAGTGC
MIRU4-R	GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU10-F	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC
MIRU10-R	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU16-F	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA
MIRU16-R	CCCCTCGTGACGCCCTGGTAC
MIRU20-F	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG
MIRU20-R	GGAGACCGCACCAGGTACTTGTA
MIRU23-F	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG
MIRU23-R	AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
MIRU24-F	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT
MIRU24-R	GGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU26-F	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC
MIRU26-R	CATAGCGCACCAGGCGAATAG
MIRU27-F	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA
MIRU27-R	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU31-F	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
MIRU31-R	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU39-F	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC
MIRU39-R	CGAAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU40-F	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT
MIRU40-R	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

基本的に Supply らの方法に従い、MIRU の以下のユニットについて、それぞれのプライマーを用いて PCR を行った。

10xBuffer 2 $\mu$ l、dNTPs (10mM each) 2 $\mu$ l、Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l、プライマー (50pmole/ $\mu$ l) 各 1 $\mu$ l、MgCl<sub>2</sub> (25mM) 1.2 $\mu$ l、DMSO 1 $\mu$ l に検体 1 $\mu$ l をよく混合し、GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler にて 94 $^{\circ}$ C 60 秒、59 $^{\circ}$ C 60 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒の条件で 40 サイクル増幅を行った。得られた増幅産物は 3%アガロースゲルにて電気泳動し、産物長を解析した。それぞれのユニットの産物の長さから繰返し配列数を計算し、12桁の整数として表示した。

(倫理面への配慮) とくに倫理が問題になる点はなかった。

### C. 研究結果

#### 1) 検査センター及び病院検査室に対する薬剤感受性試験外部精度アセスメント

研究への参加を要請した 60 施設のうち、検査センター 26 施設、病院検査室 26 施設、保健所検査室 1 施設から参加への同意を取得し、各施設に検体を送付した。平成 17 年 3 月 28 日現在検査センター 24 施設、病院 23 施設、保健所検査室 1 施設から結果の送付を受けている。尚、送付した菌株のうち 1 施設にて 1 株だけ発育しなかった株が認められた。

結果を受領した 48 施設について、感受性試験に使用された方法(製品)をみると、23 施設がピットスペクトル-SR、16 施設がウエルパック S、5 施設が Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT)、3 施設が 1% 小川培地、1 施設が BrothMIC MTB-I を使用していた。尚、3 施設については複数の方法(ウエルパック S + MGIT、MGIT + BrothMIC MTB-I およびウエルパック S + BrothMIC MTB-I) による報告があったが、解析についてはその施設で日常多く実施している方法による結果を使用した。また、1 つの検査センターにて 5 株のみ試験を行っ

たとの報告があり、これは今回の解析から除外したため、全体で47施設の精度解析となった。

今回パネルテストを実施した施設では、47施設で比率法が採用されており、1施設のみ最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) による感受性試験を採用していた。接種菌液の調整法についてみると、31施設が固体培地に発育したコロニーから菌液を調整し、一度液体培地で増菌してからそれぞれの感受性試験培地に接種していた。13施設は固体培地上のコロニーを分散させ、懸濁液から感受性試験培地への接種を行っていた。残る4施設は液体培地にて分離を行い、これを感受性試験培地に接種していた。接種時の濁度調整法をみると、目視にて MacFarland 0.5-1.0 に調整する場合は23施設、比濁計を用いて OD 0.1-0.2 に調整する場合は16施設、それら両方を実施しているのが4施設あり、濁度そのものを確認しない施設が5施設みられた。

感受性試験結果について薬剤別にみると、INH では感度の平均が100%、特異度の平均が98.9% (62.5-100)、耐性的中率の平均が99.3% (80.0-100)、感受性的中率の平均が100%、一致率の平均が99.6% (85.0-100)、再現性の平均が99.6% (90-100)であった。

RFP では感度の平均は97.7% (83.3-100)、特異度の平均が100%、耐性的中率の平均が98% (60-100)、感受性的中率の平均が96.7% (80-100)、一致率の平均が98.6% (90-100)、再現性の平均が98.9% (90-100)であった。

SM では感度の平均が87.7% (66.7-100)、特異度の平均が98.9% (87.5-100)、耐性的中率の平均が99.2% (90.9-100)、感受性的中率の平均が84.4% (66.7-100)、一致率の平均が92.2% (80-100)、再現性の平均が97.7% (70-100)であった。

EB では感度の平均が99.5% (75.0-100)、特異度の平均が98.4% (75.0-100)、耐性

的中率の平均が97.6% (72.7-100)、感受性的中率の平均が99.6% (85.7-100)、一致率の平均が98.8% (85.0-100)、再現性の平均が98.1% (70-100)であった (資料表2-5、文末)。

個々の菌株について SRLN での判定結果と、今回参加施設との判定の差違を耐性判定の数で示した (資料表6、文末)。今回は IX-5655 株について被験施設で RFP 及び SM 感受性と判定される事が多く、X-8249 株について約半数の施設で SM 感受性と判断された。また V-59 について EB 耐性とした施設が4施設みられた。その他の被験菌については全て95%以上の一致率を示していた。

それぞれの試験法での感度、特異度、一致率、再現性は資料1表7(文末)のようになった。使用施設が少ない MGIT および BrothMIC MTB-I を除いて、INH 及び RFP についてみると、小川培地およびウエルパック S に比べてビットスペクトル-SR で感度、特異度、一致率、再現性とも低い傾向が見られた。

尚、昨年度の外部精度アセスメントで精度が不十分と思われた2施設について現地でのプロセス検討と改善活動を行ったところ、今回の結果は表8(文末)の様に改善された。

## 2) 喀痰塗抹検査パネルテスト標本の開発

作製した人工喀痰は外観、粘性、塗抹作製における作業時間等、実際の患者喀痰とほぼ同等であった。スライドガラス上で作製した塗抹標本は大きさ、厚さを自由に変更可能で、外観上は患者検体から作製した標本と同じであった。顕微鏡所見としても細胞および細胞残渣が実際の検体と同程度に認められ、培養細胞を使用した事による差異はほとんど認めなかった (図1)。

抗酸菌の混入については、培養菌液を段階的に希釈することにより3+から±まで細胞・抗酸菌・合成基質混合液は冷蔵

庫内で少なくとも2週間は安定であり、作製した塗抹標本も混合液作製直後と2週間経過後で差がなかった。また、抗酸菌はこの混合液中では3日経過後に死滅し、病原性のない菌種を使用しているものの、作製過程で菌固定処理が不要であった。

図1 人工喀痰による塗抹標本 (400倍)

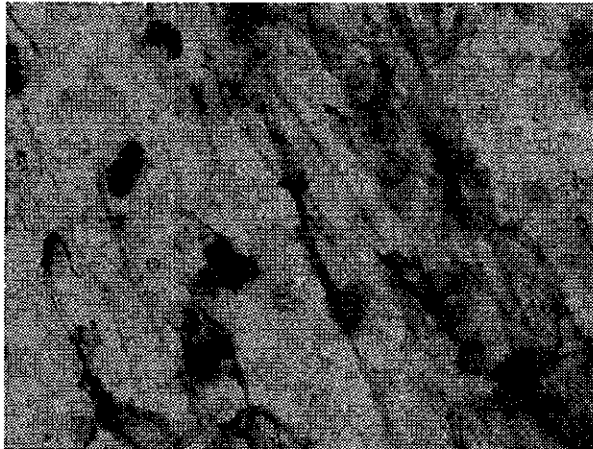


表9 MIRU解析結果

Strain	MIRU Unit Number												
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	
191	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	
155	2	2	1	3	2	5	1	7	3	4	2	3	
182	2	2	1	3	2	5	1	4	3	5	3	3	
174	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	2	3	
118	2	2	2	4	1	5	1	6	2	4	2	3	
153	2	2	3	2	2	5	1	7	2	4	3	3	
119	2	2	3	3	1	5	1	6	2	4	2	3	
134	2	2	3	3	2	5	1	3	3	4	3	3	
137	2	2	3	3	2	5	1	5	3	2	1	5	
175	2	2	3	3	2	5	1	7	2	3	1	3	
154	2	2	3	3	2	5	1	7	3	4	2	3	
178	2	2	3	3	2	5	1	7	3	4	3	4	
145	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	2	3	
184	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	2	3	
73	2	2	3	3	2	6	1	5	1	1	1	1	
103	2	2	3	3	2	6	1	5	5	3	1	1	
177	2	2	3	3	2	7	1	8	3	5	3	3	
169	2	2	3	4	2	5	1	7	3	5	3	3	
128	2	2	4	3	2	5	1	6	1	3	2	3	
160	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	
188	2	4	2	2	2	5	1	3	2	3	1	2	
67	2	7	4	3	2	5	1	7	3	4	3	3	

3) 薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法のINH基準濃度判定の差違に関する研究

23の菌株についてMIRU解析を実施した。結果は表9のようになった。

23株から22のMIRUタイプが検出された。MIRUが一致した株は145と185のみで、あとの株についてはそれぞれユニークなパターンであった。

それぞれのMIRU locusについてみると、locus 2と24では全く変異がなく、それぞれ2及び1の繰返し数であった。

尚、Strain 189についてはいくつかのlocusに複数のバンドが認められ、複数菌感染と思われたため今回の解析からは除外した。

#### D. 考察

【検査センター及び病院検査室に対する薬剤感受性試験外部精度アセスメント】

薬剤感受性試験は効果的な結核治療の基本であり、間違った検査結果は直接患者の不利益に繋がる事から、その精度を維持する事は極めて重要である。

WHO/IUATLDでは基本的にINHおよびRFPに対して感度、特異度、再現性を95%以上に保つ事を基本とし、主要4剤について一致率90%以上を目標としている。今回の結果では、INH、RFP及びEBでこの基準を満たしていたものの、SMで感度および一致率が基準を下回った。

SMにおける感度は平均87.7%であり、一致率は92.2%であったが、これはパネル内の2種の株X-8249およびIX-5655での判定一致率が低かった事による。X-8249株についてはSRLNでの判定一致率が90% (21施設中19で耐性と判定) であり、今回用いた菌株の中ではやや一致率の低いものであった。また、IX-5655株についても同様で、SRLNでの一致率は90% (20施設中18で耐性と判定) であった。全ての菌株は各株を複製して2株1組としてパネルを構成しているが、今回の参加施設では、47施設中23施設がX-8249株の両方を感受性と判定し、2施設がどちらか一方を耐性と判定していた。IX-5655株についても同様で、感受



性と判定した 10 施設全てで再現性があった。いずれの株においても再現性が高いことから、また SM において感受性株を耐性と判定している場合が少ない（高特異度：全感受性株 376 株中耐性判定 4 株のみ）ことから、技術的な問題ではなく使用している方法（製品）あるいは標準濃度の設定の問題と考えられた。

方法毎に SM の判定齟齬を検討すると、ビットスペクトル-SR で 78.3%（23 施設中 18 施設）、ウエルパック S で 25%（16 施設中 4 施設）、1%小川培地で 66.7%（3 施設中 2 施設）、MGIT で 20%（5 施設中 1 施設）で感受性と判定されていた。

平成 15 年度に実施した検査センターでの外部精度アセスメントでも SM に関する「過小評価」は認められており、前回は方法（製品）による差異は認めなかったが、今回ビットスペクトル-SR でウエルパック S や MGIT に比較して齟齬が多く認められた。しかしながら、標準法である 1%小川培地でも 2/3 の施設が感受性の判定をしていたことを考慮すると、方法としての問題だけではないと考えられ、前回と同様に、SM について Lewenstein-Jensen (L-J)培地で用いられている 4.0mg/ml の濃度に対して、日本では 10.0mg/ml が採用されている事が影響していることも考えられた。

IX-5655 株については RFP でも 7 施設で耐性菌を感受性と判定していたが、SRLN では 100%の施設間一致を認めた菌株であった。当該 7 施設のうち 4 施設は 1 組のうちどちらかを耐性と判定しており、これには手技的・技術的な問題と考えられた。

前回特異度に問題があった EB については今回判定の齟齬は殆ど認められなかった。しかしながら、全感受性株 564 株中耐性と判定されたのは 9 株（1.6%）であり、全耐性株 375 株中感受性と判定されたものが 2 株（0.5%）であったことに比べて、感受性株を耐性と判定するが多かった。これは平成 15 年度のアセスメントでもみられ

た傾向であり、「過大評価」として認識されている。元々 EB については静菌的な薬剤であることから結果の安定性に問題が言われているが、この試験結果については、SM 同様基礎培地の違いと設定薬剤濃度（L-J では 2.0  $\mu$ g/ml、1%小川では 2.5  $\mu$ g/ml）が関連していることも考えられた。

改善活動として INH および RFP について結果に齟齬が見られた施設について現地での担当者との検討を行ったところ、一つの原因として菌液調製の段階での問題が考えられた。これは全ての菌株の発育速度が同一でないため、全菌株について同一の培養時間では十分に増殖していない菌株があり、濁度が不十分であったにもかかわらずこれがそのまま接種されて判定されていたもので、100 倍希釈コントロールに十分な発育が見られないというものであった。薬剤感受性試験では菌の発育状態を揃える事と共に接種菌の濃度も重要であり、菌株により培養期間を調整して一定の濁度を得るようにすることが重要である。また、試験に用いた培地の一部で使用期間が過ぎていた可能性もあった。使用期間を過ぎた培地が使用された経緯には菌株の発送が遅れたことも影響していた。

また、菌液接種後の培養条件についてみると、培養スペースが狭小なため斜面台上での培養は 1 日以下ですぐに試験管立てに立てて培養する施設があり、凝固水が多く残っていることが観察された。管底に菌が固まってしまいコロニー数がカウントできない場合も考えられ、斜面台での培養を十分に長くすることも重要と思われた。

#### 【喀痰塗抹検査パネルテスト標本の開発】

今回開発した人工喀痰は抗酸菌塗抹検査パネルテストの実践を可能にするものであり、重要である。

従来喀痰抗酸菌塗抹検査パネルテスト標本の作製には Lan らによる NaOH を用いた方法と Kim らによる NALC による調整法が

示されているが、これらの方法によって調整された検体は一見して患者検体から調整した直接塗抹標本とは異なっており、鏡検上も比較的簡単に抗酸菌を発見する事が可能であるなど、能力評価を目的としたテストには適切でないと考えられる。何より標本の作製に患者の喀痰を利用することから、日本のような喀痰を大量に排出する患者が殆どみられない地域では材料の入手が困難であり、しかも入手した喀痰が結核菌陽性の場合には感染性の問題があり、陰性の場合でも真に陰性であることを保証する手段がなかった。

今回作製した標本はそれらの問題点を全て解決しており、基質および細胞が常に安定して入手可能であることからいつでも調整が可能である。また、人工産物であることから抗酸菌の混在がなく、非病原性の抗酸菌を定量的に混入する事からバイオハザード上の問題もなく安定性・再現性に優れている。さらに系を大きくすれば大量に作製することも可能であるため、大規模なパネルテストへの応用の可能性が高い。

今後の課題としては、基質として使用しているポリマーを加水分解性のものに変更し、さらに生菌の保存性を高めることが必要と考えられる。これは塗抹試験だけでなく引き続き行われる培養、同定、感受性試験への応用を考慮したもので、現在検討を開始している。実現すれば抗酸菌検査の総合的パネルテストツールとして有用と思われる。

**【薬剤感受性検査における液体培地迅速法と固体培地標準法のINH基準濃度判定の差違に関する研究】**

結核菌薬剤感受性試験を実施する上で液体培地を使った高感度培養法は迅速性の点で有用であり、今回の外部精度アセスメント研究に参加した施設でも5施設でMGITが日常的に使用されていた。平成15年度の本研究でINH 0.2 $\mu$ g/ml濃度における薬剤感

受性試験において、MGITによる迅速法と1%小川培地による標準法に差違が認められる例が約12%あり、しかも迅速法にて耐性と判定され、標準法にて後日感受性と判定されるという経過であったことを報告した。結果として菌のMICが比較的高値であったが、主要な領域での耐性遺伝子の関与はほとんどなく、MICのやや高い株が流行しつつあることも考えられた。

これについて検討するためVNTR-MIRUによる遺伝子解析を実施したが、同一のクラスターに属するものは2株のみであり、他は全て相対的に独立していた。従って、特殊な菌株による流行は否定されたが、現在日本ベクトン・ディッキンソンと共同で全国的にどの程度MGIT耐性・標準法感受性株が存在するか調査中であり、結果により薬剤感受性試験の方法の改善の必要性を評価することとなる。

## E. 結論

今回の研究では、平成15年度に実施した検査センターへの薬剤感受性試験の外部精度アセスメントを拡大し、実施件数の多い病院検査室にも実施を拡大した。結果として少なくともINH、RFPについては基準にかなう良好な精度管理結果を得ており、パネルの構成や試験方法そのものの問題は残るものの、事後の改善活動の有用性等、活動の価値は明確と考えられた。しかしながら、実績の多い施設で精度が高い事はむしろ当然であり、小規模の施設に対して今後どのように活動を普及するかがひとつの問題である。

薬剤感受性試験以外の塗抹・培養・同定検査については方法論が不十分である点が問題であったが、今回人工喀痰を開発したことにより塗抹を始めとして培養・同定にも実践的な方法が開発可能と考えられた。引き続き開発と実践性の検証が重要である。

## F. 健康危惧情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 御手洗聡(日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会)：検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント. 結核 (in press)
- 2) Kazumi Y, Mitarai S, Takahashi M. The evaluation of identification algorithm for Mycobacterium species using 16S rRNA coding gene and rpoB. J. Microbiol. Method (in submission)

2. 学会発表

- 1) 御手洗聡:液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験(シンポジウム). 第79回日本結核病学会総会 名古屋 2004年4月20日
- 2) Yamada H, Mitarai S, and Fujiki A. Evaluation of two methods for preparation of panel test slides using NaOH or NALC. 35th World conference on IUATLD. Paris 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

