

that type I IFNs are also induced by nonviral pathogens, such as bacteria, mycobacteria, and protozoan parasites (11, 31). In the case of bacterial infection, type I IFNs seem to have opposing effects depending on the type of bacteria (31). Although exogenous type I IFNs show protective actions in response to infection with *Salmonella typhimurium* or *Shigella flexneri*, the protective effects of endogenous type I IFNs remain unclear (32, 33). In contrast, endogenous type I IFNs reduce resistance to *Listeria monocytogenes* infection (34–36). During infection with the protozoan parasite *Leishmania major*, these exogenous IFNs presumably have a protective effect through the induction of inducible NO synthase, although the involvement of endogenous type I IFNs in antileishmanial immunity is less clear (37, 38). Following infection with *T. cruzi*, administration of exogenous $\alpha\beta$ IFN was reported to reduce the number of serum parasites (10). However, a subsequent study showed that IFNAR1^{-/-} mice were not susceptible to the infection, indicating that endogenous $\alpha\beta$ IFN do not contribute to the host defense against *T. cruzi* (39). Thus, the possible roles of type I IFNs in antitrypanosomal immune responses remain controversial. In the present study, we have clearly established that IFN- β produced by DCs and macrophages contributes to host defense against *T. cruzi*. Thus, endogenous type I IFNs produced during *T. cruzi* infection are responsible for antitrypanosomal immune responses, although the MyD88-dependent production of proinflammatory cytokines overshadows the effects of type I IFNs in normal mice. In the future, it will be interesting to investigate whether this mechanism also applies to immune responses to other protozoan parasites, such as *L. major* and *Toxoplasma gondii*.

We further analyzed the mechanisms by which IFN- β exerts antitrypanosomal responses. The p47 GTPase family members control innate immune responses to intracellular pathogens, including protozoan parasites (27, 28). Expression of p47 GTPases, such as LRG47 and IRG47, and of IGTP is induced through the activation of TLR and IFN signaling pathways during infection with intracellular pathogens. Mice lacking LRG47, IRG47, or IGTP have been shown to become sensitive to infection with *L. major* and *T. gondii*, indicating the possible involvement of these GTPases in *T. cruzi* infection (27, 40, 41). Indeed, LRG47-deficient mice have recently been shown to be sensitive to *T. cruzi* infection (42). We found that induction of IRG47 was impaired in *T. cruzi*-infected cells from MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} and MyD88^{-/-}IFNAR1^{-/-} mice. Knockdown of IRG47 in MyD88^{-/-} macrophages led to increased intracellular parasites. Thus, TLR-dependent expression of IFN- β probably mediates antitrypanosomal responses through the induction of IRG47.

Recently, MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} macrophages have been shown to produce IFN- β when infected with intracellular pathogens that escape into the cytosol, such as *L. monocytogenes* and *Legionella pneumophila* (43). In contrast, *T. cruzi*-induced IFN- β production was not observed in MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} macrophages, although this parasite also invades the cytosol (44). In the case of the cytosolic escape of *Listeria* or *Legionella*, dsDNA from the bacteria is responsible for the induction of IFN- β (43, 45). In contrast to these prokaryotic bacteria, *T. cruzi* is a eukaryote. Therefore, it seems less likely that trypanosomal DNA within the nucleus is exposed to the host cell cytosol, which may lead to the observed absence of TLR-independent induction of IFN- β . Thus, recognition of *T. cruzi* invasion is mainly dependent on TLR systems, possibly at the plasma membrane or in the phagolysosome. However, even in MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} macrophages, the gene encoding LRG47 was induced after *T. cruzi* infection, indicating the presence of TLR-independent mechanisms for gene expression. The mechanisms for the TLR-independent induction of this p47 GTPase are currently under investigation.

To date, TLR2, TLR4, and TLR9 have been implicated in the recognition of *T. cruzi*-derived components (6, 14–16). TLR2 recognizes GPI-anchored mucin-like proteins and the *T. cruzi*-released protein Tc52 (6, 46, 47), whereas TLR4 is responsible for the recognition of glycoinositolphospholipids (15). TLR9 is also involved in the recognition of the CpG motif present in *T. cruzi* DNA (14). Among these *T. cruzi*-derived components, glycoinositolphospholipids can activate the TRIF-dependent pathway to induce IFN- β via TLR4. It is also possible that currently unknown components are recognized by TLR4 or TLR3, both of which use the TRIF-dependent pathway. Identification of such components responsible for the induction of IFN- β would provide important insights toward understanding innate immune responses to *T. cruzi* infection.

Acknowledgments

We thank Y. Yamada and K. Takeda for technical assistance, and M. Kurata for secretarial assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Krettl, A. U., and Z. Brener. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009–2012.
- Rottenberg, M., R. L. Cardoni, R. Andersson, E. L. Segura, and A. Orn. 1988. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.* 28: 573–582.
- Tarleton, R. L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144: 717–724.
- Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, G. A. Martins, R. T. Gazzinelli, L. Q. Vieira, and J. S. Silva. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64: 1961–1967.
- Camargo, M. M., I. C. Almeida, M. E. Pereira, M. A. Ferguson, L. R. Travassos, and R. T. Gazzinelli. 1997. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158: 5890–5901.
- Ouassif, A., E. Guilvard, Y. Delneste, G. Caron, G. Magistrelli, N. Herbault, N. Thiebaut, and P. Jeannin. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168: 6366–6374.
- Reed, S. G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 140: 4342–4347.
- Silva, J. S., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, K. M. Mohler, D. Anderson, and S. G. Reed. 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175: 169–174.
- Sonnenfeld, G., and F. Kierszenbaum. 1981. Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 1189–1191.
- Kierszenbaum, F., and G. Sonnenfeld. 1982. Characterization of the antiviral activity produced during *Trypanosoma cruzi* infection and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.* 68: 194–198.
- Bogdan, C., J. Mattner, and U. Schleicher. 2004. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* 202: 33–48.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335–376.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499–511.
- Shoda, L. K., K. A. Kegerreis, C. E. Suarez, I. Roditi, R. S. Corral, G. M. Bertot, J. Norimine, and W. C. Brown. 2001. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor α , and nitric oxide. *Infect. Immun.* 69: 2162–2171.
- Oliveira, A.-C., J. R. Peixoto, L. B. de Arruda, M. A. Campos, R. T. Gazzinelli, D. T. Golenbock, S. Akira, J. O. Previato, L. Mendonça-Previato, A. Nobrega, and M. Bellio. 2004. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* 173: 5688–5696.
- Petersen, C. A., K. A. Krumholz, and B. A. Burleigh. 2005. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 73: 6974–6980.
- Campos, M. A., M. Closel, E. P. Valente, J. E. Cardoso, S. Akira, J. I. Alvarez-Leite, C. Ropert, and R. T. Gazzinelli. 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 172: 1711–1718.

18. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143–150.
19. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640–643.
20. Müller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918–1921.
21. Taliaferro, W. H., and T. Pizzi. 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96: 199–226.
22. Vespa, G. N., F. Q. Cunha, and J. S. Silva. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62: 5177–5182.
23. Saefel, M., B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2001. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 69: 2252–2259.
24. Silva, J. S., G. N. Vespa, M. A. Cardoso, J. C. Aliberti, and F. Q. Cunha. 1995. Tumor necrosis factor α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected γ interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 63: 4862–4867.
25. Castaños-Velez, E., S. Maerlan, L. M. Osorio, F. Åberg, P. Biberfeld, A. Örn, and M. E. Rottenberg. 1998. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect. Immun.* 66: 2960–2968.
26. Ortiz-Ortiz, L., T. Ortega, R. Capin, and T. Martinez. 1976. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50: 232–242.
27. Taylor, G. A., C. G. Feng, and A. Sher. 2004. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 100–109.
28. MacMicking, J. D. 2005. Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 74–82.
29. de Souza, A. P., B. Tang, H. B. Tanowitz, S. M. Factor, V. Shtutin, J. Shirani, G. A. Taylor, L. M. Weiss, and L. A. Jelicks. 2003. Absence of interferon- γ -inducible gene IGTP does not significantly alter the development of chagasic cardiomyopathy in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J. Parasitol.* 89: 1237–1239.
30. Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 147: 258–267.
31. Decker, T., M. Müller, and S. Stockinger. 2005. The Yin and Yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 675–687.
32. Hess, C. B., D. W. Niesel, Y. J. Cho, and G. R. Klimpel. 1987. Bacterial invasion of fibroblasts induces interferon production. *J. Immunol.* 138: 3949–3953.
33. Niesel, D. W., C. B. Hess, Y. J. Cho, K. D. Klimpel, and G. R. Klimpel. 1986. Natural and recombinant interferons inhibit epithelial cell invasion by *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 52: 828–833.
34. O'Connell, R. M., S. K. Saha, S. A. Vaidya, K. W. Bruhn, G. A. Miranda, B. Zarnegar, A. K. Perry, B. O. Nguyen, T. F. Lane, T. Taniguchi, et al. 2004. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 200: 437–445.
35. Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unanue. 2004. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J. Exp. Med.* 200: 535–540.
36. Auerbuch, V., D. G. Brockstedt, N. Meyer-Morse, M. O'Riordan, and D. A. Portnoy. 2004. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 200: 527–533.
37. Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Rollinghoff, I. Gresser, and C. Bogdan. 1998. Type I interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8: 77–87.
38. Mattner, J., A. Wanderssee-Steinhauser, A. Pahl, M. Rollinghoff, G. R. Majeau, P. S. Hochman, and C. Bogdan. 2004. Protection against progressive leishmaniasis by IFN- β . *J. Immunol.* 172: 7574–7582.
39. Ue, C., J. Andersson, and A. Orn. 2003. Role of IFN- α/β and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon- γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.* 134: 195–201.
40. Taylor, G. A., C. M. Collazo, G. S. Yap, K. Nguyen, T. A. Gregorio, L. S. Taylor, B. Eagleson, L. Secrest, E. A. Southon, S. W. Reid, et al. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN- γ -inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 751–755.
41. Collazo, C. M., G. S. Yap, G. D. Sempowski, K. C. Lusby, L. Tassarollo, G. F. Woude, A. Sher, and G. A. Taylor. 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon γ -inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* 194: 181–188.
42. Santiago, H. C., C. G. Feng, A. Bañica, E. Roffe, R. M. Arantes, A. Chcever, G. Taylor, L. Q. Vierira, J. Aliberti, R. T. Gazzinelli, and A. Sher. 2005. Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J. Immunol.* 175: 8165–8172.
43. Stetson, D. B., and R. Medzhitov. 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93–103.
44. Andrade, L. O., and N. W. Andrews. 2004. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J. Exp. Med.* 200: 1135–1143.
45. Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, et al. 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 7: 40–48.
46. Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167: 416–423.
47. Ropert, C., I. C. Almeida, M. Closel, L. R. Travassos, M. A. Ferguson, P. Cohen, and R. T. Gazzinelli. 2001. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I κ B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 166: 3423–3431.

結核菌薬剤感受性検査のための BACTEC MGIT 960 AST の評価：外部精度管理菌株を用いた研究

¹小林 郁夫 ¹阿部千代治 ²御手洗 聡

要旨：〔目的〕迅速な結核菌薬剤感受性検査法である BACTEC MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (Mycobacterium Growth Indicator Tube Antimicrobial Susceptibility Testing: MGIT AST) の精度を調べた。〔材料と方法〕評価には WHO/IUATLD が薬剤感受性検査の外部精度アセスメントに使用している菌株と結核菌 H37Rv を用いた。MGIT AST と Middlebrook 7H10 寒天培地による比率法 (比率法) でイソニアジド (INH), リファンピシン (RFP), ストレプトマイシン (SM), エタンブトール (EB) に対する感受性を測定した。得られた結果は WHO/IUATLD の Supranational Reference Laboratory Network (SRLN) の結果と比較した。〔結果〕INH と RFP の検査では, SRLN の成績を標準としたとき MGIT AST の感度, 特異性, 一致率, 再現性のいずれも 100% であった。SM の検査について, MGIT AST の SRLN の結果との一致率は 97.9%, EB の検査は 91.5% であり, 主要 4 薬剤について 90% 以上の一致率を示した。〔結論〕今回の結果から MGIT AST は WHO/IUATLD が目標として掲げた薬剤感受性検査の精度, すなわち検査の感度, 特異性, 再現性および一致率を満足させる迅速な検査であると考えられる。

キーワード：MGIT AST, 薬剤感受性検査, 結核菌, WHO/IUATLD

はじめに

薬剤感受性検査の結果は患者の治療のみならず薬剤耐性結核菌の出現にも影響を与えることから, 検査の精度管理は重要である。薬剤感受性検査は抗酸菌の検査の中で最も精度管理の難しい検査である。世界保健機関 (World Health Organization: WHO) と国際結核肺疾患予防連合 (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: IUATLD) は世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを実施するにあたり, 世界で 20 数カ所の研究所または大学の研究室を Supranational Reference Laboratory (SRL) に選び, 薬剤感受性検査の精度管理研究をスタートさせた¹⁾。WHO/IUATLD のコーディネーターから SRL に薬剤耐性菌を含む結核菌を送付し, SRL のネットワーク (SRLN) で標準化し, それらの菌株をサーベイランス実施国の精度管理に用いている。わが国でも日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が上記の菌株を用

いて医療機関や検査センターを対象に薬剤感受性検査の外部精度アセスメントを実施しており²⁾, その結果手技の習熟や使用方法による特性を把握することなど, 改めて精度管理の重要性が明らかになった。

検査の所要日数の長短は患者の治療や管理に影響することから, 時宜にかなった検査結果の報告は微生物検査室に課せられた重要な責務である。わが国で現在用いている小川培地による結核菌の薬剤感受性検査は結果を得るまでに約 1 カ月を要することから, より短時間で結果が得られる検査が望まれている。米国の Centers for Disease Control and Prevention (CDC) から出された検査の所要日数についての提案では, 検体入手後結核菌の薬剤感受性検査の結果を 30 日以内に臨床医に報告することとしており⁴⁾⁵⁾, これは固形培地を用いた従来法で達成することは不可能である。液体培地を用いる BACTEC 460 TB や MGIT AST システムの迅速性と有用性に関する報告は数多くみられる^{6)~12)}。米国やヨーロッパ諸国では液

¹日本ベクトン・ディッキンソン株式会社ダイアグノスティックス事業部, ²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

連絡先: 小林郁夫, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社ダイアグノスティックス事業部, 〒960-2152 福島県福島市土船字五反田 1 (E-mail: ikuo_kobayashi@bd.com)
(Received 19 Oct. 2005 / Accepted 9 Nov. 2005)

体培地を用いる薬剤感受性検査が推奨されており、わが国でも今後普及していくものと思われる。

以前にわれわれは臨床分離株を用い MGIT AST と小川法の成績を比較した結果を報告した¹⁰⁾。今回 WHO/IUATLD が薬剤感受性検査の外部精度アセスメントに使用している菌株を用い、MGIT AST の精度を再評価したので報告する。

検査材料と方法

(1) 菌株

WHO/IUATLD のコーディネーターから分与された結核菌 50 株と結核菌 H37Rv (ATCC 27294) を評価に用いた。これらの結核菌は WHO/IUATLD の SRLN で標準化された菌株である。

(2) 接種菌液の調製

被検菌を 2% 小川培地に接種後 37℃ で約 4 週間培養した。培地表面の集落を満遍なくかきとり 5 mL の Middlebrook 7H9 培地に懸濁後 37℃ で静置培養した。毎日 1 回攪拌し、培養液の濁度が McFarland #0.5 を超えるまで培養した。濁度計と滅菌蒸留水を用い、培養液から McFarland #0.5 濁度の菌液を調整した。

(3) MGIT AST

BACTEC MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズの添付文書に従い、結核菌薬剤感受性用 MGIT チューブに専用サプリメントと薬剤を添加した。検査に用いた薬剤の濃度は、INH: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、RFP: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、SM: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EB: 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。McFarland #0.5 に調整した菌液を滅菌蒸留水で 5 倍希釈し、薬剤添加 MGIT チューブへの接種菌液とした。コントロール用 MGIT チューブへの接種には、接種菌液を滅菌蒸留水でさらに 100 倍希釈したものをを用いた。菌液を各 MGIT チューブに 0.5 mL 接種後、直ちに BACTEC MGIT 960 全自動抗酸菌培養装置 (MGIT 960) で培養を開始した。MGIT AST は、培養開始 4 日目より 13 日目までの間にコントロール用 MGIT チューブの菌発育を示す蛍光強度が一定値を越えた時点で薬剤添加 MGIT チューブの蛍光強度を測定し、個々の薬剤に対する被検菌の感受性を判定するシステムである。

(4) Middlebrook 7H10 培地による比率法

National Committee for Clinical Laboratory Standards (現 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) M24-A に記載されている方法に従い Middlebrook 7H10 寒天培地を調製した¹³⁾。検査に用いた薬剤の濃度は、INH: 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、RFP: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、SM: 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EB: 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。McFarland #0.5 に調整した菌液を滅菌蒸留水で 100 倍希釈し、薬剤添加 Middlebrook 7H10 寒天培地への接種菌液とした。コントロール用 Middlebrook

7H10 寒天培地への接種には、接種菌液を滅菌蒸留水でさらに 100 倍希釈したものをを用いた。菌液を各培地に塗布後 5%CO₂ 条件下 37℃ で培養し、3 週目に判定した。

(5) 評価方法

MGIT AST および Middlebrook 7H10 寒天培地による比率法 (比率法) の結果について、WHO/IUATLD の SRLN の結果を標準として感度、特異性、一致率、耐性的中率 (PV-R)、感受性的中率 (PV-S) を計算し評価した¹⁾。感度は SRLN の結果が耐性のものを正しく耐性と判定した割合、特異性は SRLN の結果が感受性のものを正しく感受性と判定した割合、一致率は SRLN の結果がそれぞれの薬剤について耐性、もしくは感受性と判定したものを同様に判定した割合である。PV-R は耐性と判定したとき、その判定が正解である確率、PV-S は感受性と判定したときの正解率である。なお、今回評価に用いた菌株の中で SRLN 内の一致率が 70% 以下の菌株は RFP の検査で 6 株、SM で 3 株、EB で 3 株あり、これらはそれぞれの薬剤についての精度計算から除外した。

MGIT AST の再現性は、被検菌の中から無作為に選んだ 6 菌株を用い、MGIT AST の 4 薬剤について 1 日 3 回、3 日間繰り返す (1 菌株、1 薬剤につき計 9 回の検査) 測定し、SRLN の結果との一致率で評価した。

結 果

(1) MGIT AST の再現性試験

無作為に選んだ 6 株を用い MGIT AST システムの再現性を調べた。計 212 検査を行い、全体の一致率は 95.3% であった (Table 1)。INH と RFP の試験の一致率は 100% であったが、SM と EB の試験で SRLN の結果と一部異なる成績がみられた。特に EB の試験で一致率は 90% 以下であった。

(2) 外部精度アセスメント株を用いた MGIT AST システムの評価

WHO/IUATLD の SRLN で精度アセスメントに使用している 50 株の臨床分離結核菌および結核菌標準株 H37Rv を用い MGIT AST の精度を評価した。同時に CLSI が標準法としている Middlebrook 7H10 寒天培地を用いる比率法で検査を行い比較した。

INH 感受性検査では、MGIT AST の結果は SRLN の結果とすべて一致した (Table 2)。感度、特異性、一致率、PV-R、PV-S のいずれも 100% であった (Table 3)。比率法の結果は MGIT AST の成績と同様に SRLN の結果といずれも 100% 一致した。

使用した 50 株のうち、6 株は RFP の感受性検査で SRLN 内の一致率が 70% 以下であったため RFP の精度計算から除外し、44 株の結果で評価した。RFP 感受性検査では INH の検査と同様に MGIT AST の結果は SRLN の

Table 1 Reproducibility testing of the BACTEC MGIT 960 AST system

Drug	No. of results	No. of results agreeing with SRLN	Agreement (%)
Isoniazid	53	53	100
Rifampin	53	53	100
Streptomycin	53	49	92.5
Ethambutol	53	47	88.7
Total	212	202	95.3

Reproducibility was assessed with six strains of *M. tuberculosis* in triplicate from three separately prepared inocula (i.e., nine replicate per strain).

Table 2 Comparison of drug susceptibility test results

Drug	No. of isolates with the following results					
	SRLN	R	R	R	S	S
	MGIT	R	R	S	S	S
	7H10	R	S	R	R	S
Isoniazid		32	0	0	0	18
Rifampin		18	0	0	0	26
Streptomycin		20	1	1	0	25
Ethambutol		15	0	4	2	26

SRLN: Referee results of the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network

MGIT: BACTEC MGIT 960 AST system

7H10: Proportion method on Middlebrook 7H10 agar

Table 3 Comparison of the results with the BACTEC MGIT 960 AST system or proportion method on Middlebrook 7H10 agar with the results of the WHO SRL Network

	Sensitivity	Specificity	PV-R	PV-S	Agreement
BACTEC MGIT AST					
Isoniazid	100	100	100	100	100
Rifampin	100	100	100	100	100
Streptomycin	95.5	100	100	96.2	97.9
Ethambutol	78.9	100	100	87.5	91.5
Proportion method					
Isoniazid	100	100	100	100	100
Rifampin	100	100	100	100	100
Streptomycin	95.5	100	100	96.2	97.9
Ethambutol	100	92.9	90.5	100	95.7

Sensitivity: Ability to detect true resistance

Specificity: Ability to detect true susceptibility

PV-R: Predictive value for resistance

PV-S: Predictive value for susceptibility

結果と完全に一致した。感度、特異性、一致率、PV-R、PV-Sはすべて100%であった。比率法の結果もMGIT ASTとまったく同様であり、いずれも100%であった。

SMに対する感受性検査でSRLNの結果と不一致となった菌株はMGIT ASTと比率法でそれぞれ1株ずつ認められた。それらのうち1株はSRLNの結果が耐性をMGIT ASTで感受性として、別の株はSRLNで耐性と判定した株を比率法で感受性と判定していた (Table 2)。Table 3に示したようにSM検査におけるMGIT ASTおよび比率法のSRLNの結果との一致率は97.9%であった。

EBに対する感受性検査でSRLNの成績と不一致の結

果を示した菌株はMGIT ASTで4株、比率法で2株認められた。MGIT ASTで不一致であった4株はいずれもSRLNで耐性と判定したものを感受性と判定していた。一方比率法で不一致の結果を示した2株ともSRLNで感受性と判定した菌株であり比率法で耐性と判定していた。MGIT ASTのSRLNの結果との一致率は91.5%、比率法の一致率は95.7%であった。

MGIT AST検査用チューブに菌接種後感受性の検査結果が得られるまでに要した日数は6日～13日の範囲であり、中央値は7日であった。一方比率法の所要日数は3週間であった。

考 察

WHO/IUATLDはINHとRFPの感受性検査の感度、特異性、再現性を95%以上に保つこと、SM、EBを加えた主要4薬剤について全体の一致率を90%以上に保つことを目標として掲げている。今回の実験で、MGIT ASTの結果はINHとRFPについてはすべての菌株でSRLNの結果と一致したことから感度、特異性、一致率、PV-R、PV-Sのすべてが100%であった (Table 3)。またINHおよびRFPの再現性試験の結果も100%であった。さらに、SMの一致率は97.9%、EBの一致率は91.5%であり、4薬剤の一致率は90%以上であった。これらの成績は、MGIT ASTがWHO/IUATLDの掲げた精度目標を満足させる検査であることを示している。なおWHO/IUATLDの検査精度アセスメントでは、SRLNの大多数が報告した結果をその菌株のゴールドスタンダードとして精度を計算しており¹⁾、SRLN内の一致率が70%以下の菌株はその結果をゴールドスタンダードとすることが不適当であると考え精度計算から除外している¹⁵⁾。今回の研究では、SRLNの考えに従い一致率が70%以下の菌株を精度計算から除外した。

SRLNの成績と不一致の結果を示した株がMGIT ASTによるEBの検査で4株、SMの検査で1株みられた (Table 2)。これらの菌株の比率法による検査結果はSRLNと一致していた。EBの検査で不一致の結果を示した4株のうち3株はSRLN内でも80%以下 (78.3%、78.9%、78.9%) の低い一致率であり、一部の株では検査法や検査条件により異なる結果が出ることを示された。残りの1株はSRLN内のEB検査で95.5%と高い一致率を示した株である。この株についてはMGIT ASTで検査を数回繰り返したが同じ結果であり、不一致の理由はわからない。SMの検査で不一致の結果を示した1株は、SRLN内での一致率は94.7%と高く、この株についても検査を繰り返したが同じ結果であり不一致の理由は不明である。

1994年からSRLN内で年1回薬剤感受性検査の精度試験を実施している。INHとRFPの検査精度は試験開始以来比較的良好であったが、SMとEBについては開始初期にはSRLN内の一致率が低かった^{1) 14) 15)}。特にEBは再現性を得ることが難しい薬剤であると考えられている^{7)~10) 16) 17)}。RobertsらはMiddlebrook 7H10寒天培地を用いる比率法をゴールドスタンダードとして比較したときBACTEC 460 TBによるEB検査の感度は66%を超えなかったと報告している¹⁸⁾。今回のMGIT ASTによるEB検査の感度は78.9%であり、他の3薬剤についての検査の感度と比べ明らかに低い値であった。一方、Middlebrook 7H10寒天培地による比率法の感度は100%で

あった。EBの検査に用いている薬剤の濃度はMGIT ASTもMiddlebrook 7H10による比率法も同じ5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、MGIT ASTの比較的低い感度は検査に用いた薬剤の濃度とは関係なく検査法の違いに起因しているものと考えられる。EBの検査で不一致の株はすべてSRLNで耐性と判定した株をMGIT ASTで感受性と判定しており、MGIT ASTでは感受性に判定される傾向がみられた。

MGIT ASTは迅速に結果が得られる検査として知られている^{7)~12)}。今回の実験で菌接種後測定が終了するまでの所要日数は6日~13日の範囲 (中央値: 7日) であり、高い迅速性が再確認された。検査材料の入手後MGITによる結核菌の検出までに要する平均日数は約2週間である^{19)~23)}。液体培養で陽性を示した培養液の少量を結核菌群特異抗原であるMPB64を検出するキャピリアTBのサンプルウエルに添加し15分静置することで迅速に結核菌群を鑑別できる^{24) 25)}。同定結果が結核菌群であれば陽性MGITチューブの培養液から直接MGIT ASTで薬剤感受性を検査できる。このように、一連の検査に液体培地に基づくMGITシステムを用いることにより、分離、同定、薬剤感受性のすべての検査結果を30日以内に担当医に報告することとする目標を達成することが可能である。

結核の診断をより早期に行うことは患者の治療のみならず、感染拡大の防止、予防、ひいてはわが国の結核罹患率の減少に大きく影響する。迅速かつ精度の高い方法を組み合わせることで早期の診断、治療に有用な検査情報を提供することは微生物検査室の大きな責務である。現在入院期間の短縮が求められており、迅速に薬剤感受性を測定できるMGIT ASTシステムは、今後の結核の診断治療に非常に有用であると考えられる。

謝 辞

結核菌株を分与いただいたWHO/IUATLDのコーディネーターであるLaszlo博士 (WHO Collaborating Centre for Tuberculosis Bacteriology, Ottawa) およびPortaelsとvan Deunの両博士 (Mycobacteriology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen) に深謝します。また本研究は日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 高橋洋氏の協力のもとに行われた。なお本論文の趣旨は第80回日本結核病学会総会 (2005年5月12日, 大宮) で発表した。

文 献

- 1) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB 97.229. WHO, Geneva, Switzerland, 1998.

- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：抗酸菌検査の精度管理 (3) —検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験の外部精度アセスメント. 結核. 2005 ; 80 : 47-48.
- 3) 御手洗聡：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. 2005 ; 80 : 349-358.
- 4) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al. : The resurgence of tuberculosis : is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 767-770.
- 5) CDC: National plan for reliable tuberculosis laboratory service using a system approach: recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force on tuberculosis laboratory service. Morbid Mortal Weekly Rep. 2005 ; 54 (RR-6): 1-12.
- 6) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他 : Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997 ; 72 : 187-192.
- 7) Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, et al. : Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 150-154.
- 8) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al. : Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculosis drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 607-610.
- 9) Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, et al. : Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. J Microbiol Methods. 2004 ; 56 : 291-294.
- 10) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重 : BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験 : 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 2001 ; 76 : 657-662.
- 11) 富田元久, 竹野 華, 鈴木克洋, 他 : バクテック MGIT 960 による薬剤感受性検査における接種菌量の検討と検査の再現性. 結核. 2004 ; 79 : 625-630.
- 12) 古畑由紀江, 菊地勇治, 田澤庸子, 他 : BACTEC MGIT™ 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズの基礎的検討. JARMAM. 2004 ; 15 : 7-13.
- 13) NCCLS : Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic *Actinomycetes* ; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 2003.
- 14) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.2. Prevalence and trend. WHO/CDS/TB 2000. 278. WHO, Geneva, Switzerland, 2000.
- 15) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.3. WHO/HTM/TB/2004. 343. WHO, Geneva, Switzerland, 2004.
- 16) Bergmann JS, Woods GL : Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 3325-3327.
- 17) Siddiqi SH, Libonati JP, Middlebrook G : Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1981 ; 13 : 908-912.
- 18) Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al. : Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. J Clin Microbiol. 1983 ; 18 : 689-696.
- 19) 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迅速培養システムの検討. 感染症誌. 1996 ; 70 : 360-365.
- 20) 斉藤 肇, 螺良英郎, 山中正彰, 他 : 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. 1997 ; 24 : 897-903.
- 21) 三浦隆雄, 長谷川直樹, 鈴木紀久雄, 他 : MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 抗酸菌検査システムの検出率と迅速性の評価. 日本臨床微生物学雑誌. 2000 ; 10 : 125-130.
- 22) Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. : Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 748-752.
- 23) 青野昭男 : 最近の抗酸菌検査 : 培養検査 MGIT. 臨床と微生物. 2001 ; 28 : 253-261.
- 24) 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.
- 25) Hasegawa N, Miura T, Ishii K, et al. : New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 908-912.

Original Article

BACTEC MGIT 960 SYSTEM FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: A STUDY USING
EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT STRAINS¹Ikuo KOBAYASHI, ¹Chiyoji ABE, and ²Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To evaluate the performance of the BACTEC MGIT 960 system for drug susceptibility testing (MGIT AST) of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid, rifampin, streptomycin and ethambutol.

[Design] Fifty external quality assessment strains of *M. tuberculosis* provided by the Coordinating Centers of WHO/IUATLD were tested by BACTEC MGIT 960 system, and the results were compared with the referee results of the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network (SRLN).

[Results and conclusion] Overall concordance rates of the results obtained by MGIT AST and the referee results of the SRLN were 97.3% for four first-line drugs. Agreement rates were particularly high for isoniazid, rifampin, and streptomycin (agreement rate of over 97%), but somewhat lower for ethambutol, which relates to a lower sensitivity of MGIT AST. Turnaround times from inoculation to drug susceptibility results ranged from 6 to 13 days for the MGIT AST system with a median time of 7 days; this contrasted with three weeks for the proportion method using Middlebrook 7H10 agar,

indicating that MGIT AST system has the potential to consistently meet with the turnaround time guidelines suggested by the Centers for Disease Control and Prevention of the United States. These results demonstrate that the fully automated BACTEC MGIT 960 AST system is useful for the rapid diagnosis of drug resistant tuberculosis.

Key words: MGIT AST, Susceptibility test, *Mycobacterium tuberculosis*, WHO/IUATLD

¹Fukushima Laboratory, Nippon Becton Dickinson Company, Ltd. Japan, ²Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Ikuo Kobayashi, Nippon Becton Dickinson Company, Ltd., 1 Gotanda, Tsuchifune, Fukushima-shi, Fukushima 960-2152 Japan.

(E-mail: ikuo_kobayashi@bd.com)

培養陰性、非結核性抗酸菌混在時における結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットの有用性*

吉田志緒美¹⁾/鈴木克洋¹⁾/岡田全司¹⁾/富田元久²⁾/坂谷光則³⁾

(SUMMARY) 薬剤感受性試験の実施が不可能な培養陰性の喀痰材料2例と、結核菌と非結核性抗酸菌(NTM)との混在菌株2例について、結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットを用いて、耐性遺伝子変異の検出を試みた。すべての検査対象において迅速な耐性遺伝子検査結果が得られ、NTM混在例では耐性遺伝子検査結果と後に分離した結核菌に対しての薬剤感受性結果は一致した。結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットは培養陰性例やNTM混在例の場合に臨床的に有用であると考えられた。

(KEYWORDS) 結核菌、薬剤耐性遺伝子検査、薬剤感受性試験、培養陰性、NTM混在

はじめに

結核菌の薬剤感受性試験は有効な抗結核薬を選定し、的確な治療を実施するためには欠かせない検査である。また多剤耐性結核菌の出現と蔓延を予防するには正確かつ、迅速な薬剤感受性試験が求められている。しかし現在の抗酸菌検査体制では、増殖速度の遅い結核菌の培養判定に4週間以上の期間を要し、さらに結核菌と同定された菌株に対して薬剤感受性試験を続行するという過程をたどる。通常の薬剤感受性試験は、小川固形培地上での培養発育を比率法で判定するものであり、結果判明には早くても4週間もの時間が

さらに必要になる。液体培地であるMycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT)を用いた薬剤感受性試験では通常の方法に比べて迅速に結果が判明するが^{1,2)}、非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria; NTM)混在時には結核菌の分離培養ができないため、正確な薬剤感受性試験結果が出ない欠点がある。そのため再度固形培地を用いて結核菌を分離培養しなければならず、さらに結果判明に時間を要することになる。また結核の可能性が高い塗抹陽性患者で、培養がどうしても陽性にならない例が稀にある。近年結核菌の薬剤耐性とその遺伝子変異との関連を明らかにする研究が盛んになり³⁾、これらの遺伝子変異部位をターゲットとして薬剤耐性を検出する方法の開発が試みられている。代表的な手法としてPCR-RFLP法や、PCR-SSCP法などがあるが、煩雑な手技や判定の困難さがあり、これらの方法を日常的に臨床検査に用いることは難しい。今回筆者らは、簡便で判定も容易な結核菌薬剤耐性遺伝子検査キットを、塗抹陽性培養陰性サンプルとNTM混在菌株に対して使用し、有用性の検討を試みた。

対象と方法

対象は独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの肺結核患者から得られた塗抹陽性培養陰性

* Evaluation of the anti-mycobacterial susceptibility tests using rapid detection of mutation in drug-target genes for *Mycobacterium tuberculosis*: samples of culture-negative or contaminated with nontuberculous mycobacteria

- 1) YOSHIDA Shiomi, SUZUKI Katsuhiko, OKADA Masaji: Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Osaka
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター(☎591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180)
- 2) TOMITA Motohisa: Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Osaka
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床検査科
- 3) SAKATANI Mitsunori: Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Osaka
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター内科

喀痰材料2例ならびにNTM混在菌株2例。また耐性遺伝子検査キットの有用性を検討するため、塗抹陽性培養陽性菌株11例(全剤感受性菌株5例、耐性菌株6例)および結核菌標準菌株H37Rvを用いた。

1. 塗抹陽性培養陰性喀痰材料

サンプル1: 22歳女性からの喀痰材料。集菌塗抹Gaffky2号の陽性、アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス(ロシュ・ダイアグノスティックス)陽性。MGIT, 小川KY培地(セロテック)ともに培養陰性。入院期間中この患者からは培養陽性のサンプルが得られなかったため、耐性遺伝子検査を実施した。

サンプル2: 63歳女性からの喀痰材料。集菌塗抹Gaffky1号の陽性、アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス陰性。MGIT, 小川KY培地ともに培養陰性。当院入院以前、他の医療機関受診中に、同患者サンプルから結核菌が培養され、薬剤感受性試験を実施していたが、芳しくない治療成績から薬剤感受性試験の再検を求められた。しかし培養された結核菌株が保存されておらず、結果もあいまいであったため、耐性遺伝子検査を実施した。症例1同様当センターでのサンプルはすべて培養陰性であった。

2. NTM混在結核菌株

菌株A: 60歳男性喀痰材料からの臨床分離菌株。結核菌と *M. avium* 菌との2菌種混在であった。結核菌のみを単一分離するのに多大な時間がかかり、迅速な薬剤感受性試験に進めないことから、耐性遺伝子検査を実施した。

菌株B: 88歳女性喀痰材料からの臨床分離菌株。結核菌と、*M. intracellulare* 菌との混在であった。症例Aと同様に、結核菌株純化にかなりの期間が必要となったため、耐性遺伝子検査を行うこととなった。

3. 方法

OligoArray-TB(日清紡)はDNAマイクロアレイを応用した結核菌薬剤耐性遺伝子変異の迅速検出法である⁴⁾。まずアレイ上に結核菌同定および、薬剤耐性判定に必要なDNAオリゴマーがあらかじめ固定されており、喀痰もしくは培養コロニーから抽出したDNAを用いて、関与する遺伝子領域をPCRで増幅し、PCR増幅産物とアレイ上の固定オリゴマーとをハイブリダイゼーションする。そしてハイブリダイズした場所を化学発色して検出し、発色の場所により結核菌の有無や薬剤耐性の有無を判定する。図1-aにDNAマイクロアレイ上のキャプチャーオリゴヌクレオチドの配置を示す。

フィノス LiPA Rif TB(ニプロ)は抗酸菌から抽出、

増幅されたビオチン化DNAを用いて、結核菌群の *rpoB* 遺伝子内の変異を検出する Line Probe Assay である⁵⁾。10種類のプローブを固相化したストリップにNaOH変性した検体を添加して、ハイブリダイズする。洗浄後、ビオチン-アビジン結合を行い、基質(NBT/BCIP)を用いた発色反応から、検体が結合したプローブ部位が発色する。発色したプローブの位置から、結核菌群の検出ならびに *rpoB* 遺伝子内の変異の有無の判定を行う。図1-bに測定原理の模式図を示す。

培養陽性検体については結核菌群同定試薬「キャピリア TB」(タウンズ)を用いて同定を行った。また薬剤感受性試験として、“ニチビー”抗酸菌検査用ウエルパック培地S(日本ビーシージー)とバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査法(MGIT-AST法:日本ベクトン・ディッキンソン)を実施した。

サンプル1および2は必要とされる菌株が得られなかったため、薬剤感受性試験は実施できず、耐性遺伝子検査のみを行った。菌株A, Bについては、NTM混在菌株と、後に単一分離された結核菌株の両方に耐性遺伝子検査を実施し、単一分離結核菌株に対して薬剤感受性試験を行った。またNTM混在菌株と単一分離菌株について同一の結核菌であることを証明するためにIS6110-RFLP解析も実施した。

■ 結果

サンプル1はOligoArray-TBにて、リファンピシン(RFP)とストレプトマイシン(SM)耐性配列オリゴマーに発色が認められ、RFP・SM耐性と判定された。フィノス LiPA Rif TBでは、野生型S5プローブが欠損し、同時に変異型R5プローブに発色が認められ、RFP耐性と判定された(図2)。

サンプル2はOligoArray-TBにて、イソニアジド(INH)感受性配列オリゴマーに欠損が見られ、SM耐性配列オリゴマーに発色が認められたため、INH・SM耐性と判定された。フィノス LiPA Rif TBではOligoArray-TB同様に、RFP感受性と判定された(図2)。

NTM混在菌株Aは、OligoArray-TBにてINH感受性配列オリゴマー欠損、SM耐性配列オリゴマー検出となり、INH・SM耐性と判定された。また *M. avium* 陽性オリゴマーに発色が見られ、*M. avium* の混在が確認された。この株より分離した結核菌株も、NTM混在菌株と同様にINH・SM耐性の結果であった(図3)。フィノス LiPA Rif TBでは、NTM混在菌株、結核菌単一分離菌株ともに *rpoB* 感受性プロ

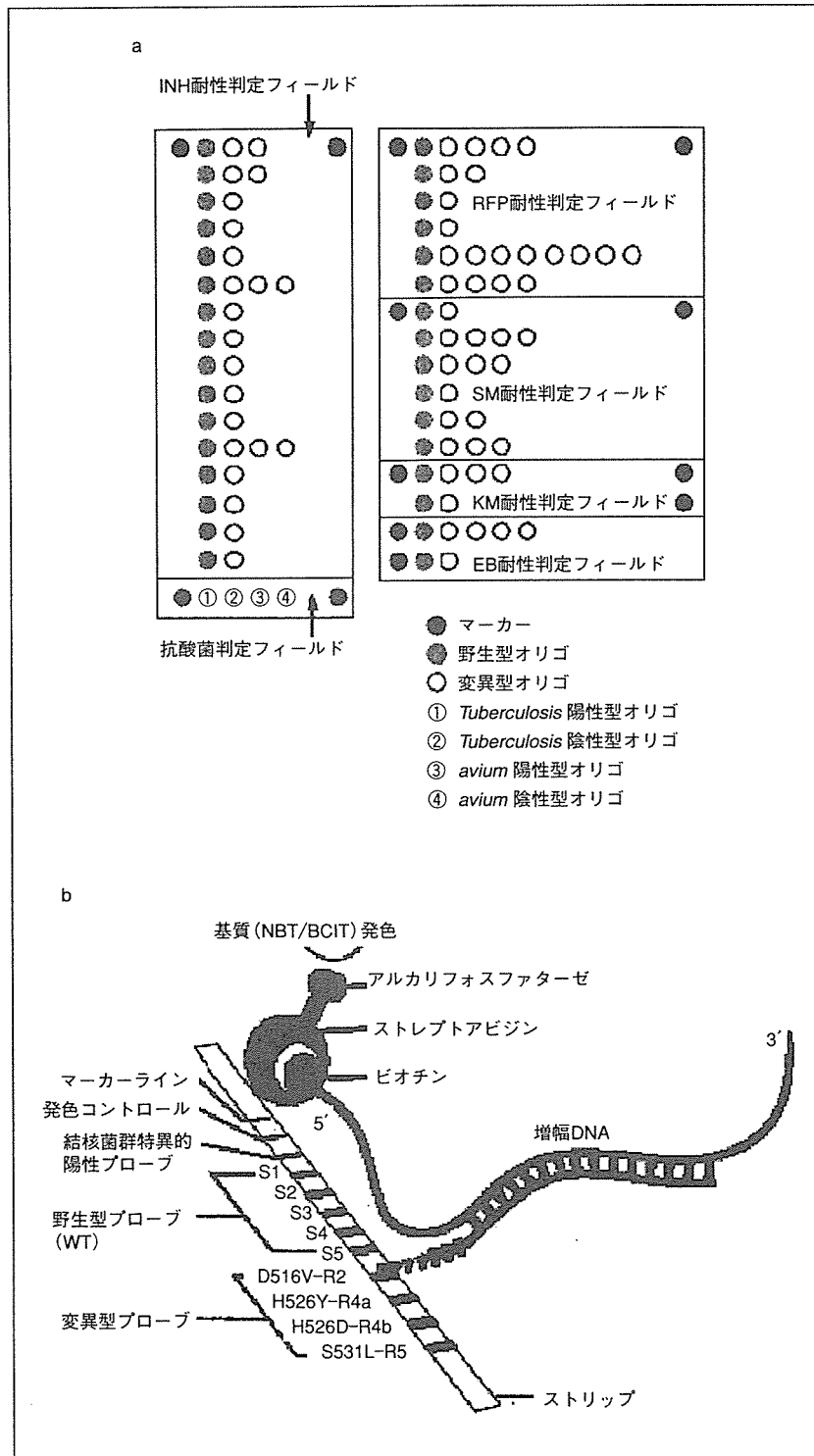


図1 結核菌の薬剤耐性遺伝子検査キット
 a: OligoArray-TB(日清紡資料), b: フィノス LiPA Rif TB(ニプロ資料)

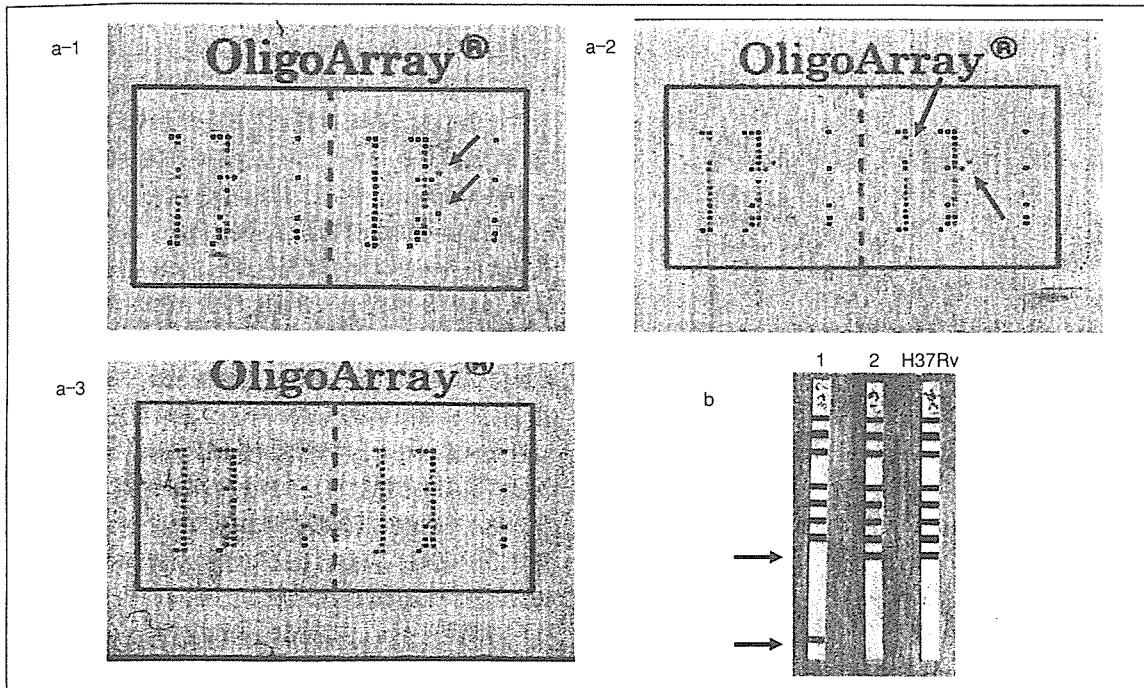


図2 培養陰性喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果
 a : OligoArray-TB 判定結果. a-1 : サンプル 1 (RFP, SM 耐性), a-2 : サンプル 2 (INH, SM 耐性),
 a-3 : 結核菌標準菌株 H 37 Rv (陽性反応 Control), b : フィノス LiPA Rif TB の判定結果, 1 : RFP 耐性 (サンプル 1),
 2 : RFP 感受性 (サンプル 2), H 37 Rv : 陽性反応 Control.

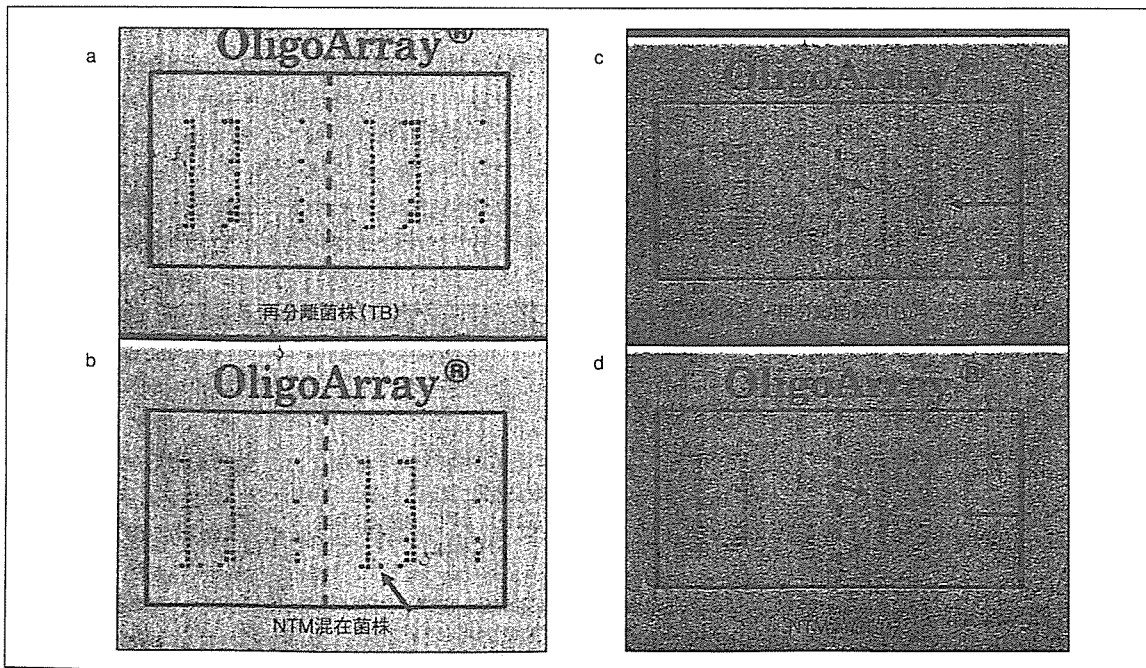


図3 NTM 混在喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果
 a : 結核菌分離培養後菌株 A からの DNA, b : NTM (*M. avium*) 混在時菌株 A からの DNA, c : 結核菌分離培養後菌株
 B からの DNA, d : NTM (*M. intracellulare*) 混在時菌株 B からの DNA.

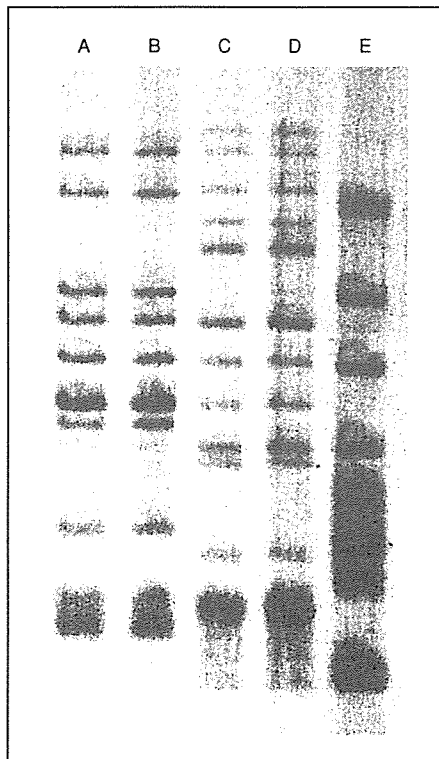


図4 IS6110-RFLP 解析結果
 A: 結核菌分離培養後菌株 A からの DNA,
 B: NTM(*M. avium*)混在時菌株 A からの DNA, C: 結核菌分離培養後菌株 B からの DNA, D: NTM(*M. intracellulare*)混在時菌株 B からの DNA, E: 結核菌標準菌株 H 37 Rv.

ープに発色が認められ、RFP 感受性と判定された。薬剤感受性試験との比較では、ウエルパック法、MGIT-AST 法ともに INH, SM 耐性と判定され、耐性遺伝子判定結果と同一であった。IS 6110-RFLP 解析では同じパターンであり、単離前後の結核菌は同一の菌株であると考えられた(図 4)。

NTM 混在菌株 B は、OligoArray-TB にて 5 薬剤感受性配列オリゴマーに発色が見られ全剤感受性と判定された。結核菌単一分離菌株も NTM 混在菌株同様に全剤感受性であった(図 3)。フィノス LiPA Rif TB では、NTM 混在菌株、結核菌単一分離菌株ともに *rpoB* 感受性プローブに発色が認められ、RFP 感受性と判定された。薬剤感受性試験では、ウエルパック法、MGIT-AST 法ともに全薬剤感受性と判定された。IS 6110-RFLP 解析結果も同じパターンであり、菌株 A と同様、単離前後の結核菌は同一株であると考えられた(図 4)。

培養陽性検体 11 例に対する薬剤感受性試験と耐性遺伝子検査キットの比較では、全剤感受性菌株 5 例ならびに結核菌標準菌株 H 37 Rv はすべて耐性遺伝子検査キットで感受性菌と判定され、耐性菌株 6 例は薬剤感受性試験結果と同じ結果が耐性遺伝子検査キットでも確認できた(表 1)。

■ 考察

臨床的に肺結核の可能性が高く塗抹が陽性であるにもかかわらず、培養がどうしても陽性にならない症例

表 1 薬剤感受性試験結果と耐性遺伝子検査結果の比較

Sample	薬剤感受性試験		耐性遺伝子検査		
	MGIT-AST	ウエルパック S	OligoArray- TB	フィノス LiPA Rif TB	変異 パターン
Control*	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	
2	S	S	S	S	
3	S	S	S	S	
4	S	S	S	S	
5	S	S	S	S	
6	R (INH, RFP)	R (INH, RFP, KM)	R (INH, RFP, KM)	R	S1 欠損
7	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R	S5 欠損 R5
8	R (RFP)	R (RFP)	R (RFP)	R	S5 欠損 R5
9	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R	S4 欠損 R4b
10	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S5 欠損 R5
11	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S5 欠損 R5

S: anti-*Mycobacterium tuberculosis* drugs susceptible (isoiazid (INH), rifampicin (RFP), ethambutol (EB), kanamycin (KM), streptomycin (SM))

R: anti-*Mycobacterium tuberculosis* drugs resistant

*: *Mycobacterium tuberculosis* 標準菌株 H 37 Rv

が稀にある。この場合塗抹陽性サンプルから薬剤耐性遺伝子を抽出・増幅し変異の有無を検討することで、薬剤感受性を推定することが可能と考えられる。今回検討した薬剤耐性遺伝子検査キットを使用することで、塗抹陽性培養陰性の2サンプルから薬剤耐性の結果が得られた。通常の薬剤感受性試験が施行不能なので、その結果を検証することはできないが、臨床経過から正しい結果であったと判断している。

一般に結核菌にNTMが混在すると、培地上でNTMの増殖が結核菌より優勢であるため、結核菌単一分離作業には検査技師の熟練と多大な時間を要することになる。少しでもNTMが混在していると、正確な結核菌の薬剤感受性試験結果が得られないため、このような作業が必要であることは言うまでもない。今回検討した2つの薬剤耐性遺伝子検査キットは結核菌に特異的なプローブを使用しているため、NTM混在株においても正確な薬剤感受性試験結果を得ることができた。このため単一結核菌コロニー分離の過程が不要となり、薬剤感受性結果の迅速化に資するところ大である。

日本結核病学会の抗酸菌検査法検討委員会から提案されている小川培地に比率法を適応する薬剤感受性試験^{6,7)}では、多剤耐性結核菌で時に認められるような培地上での発育が極めて悪い菌の場合、感受性結果が得られないことも考えられる。このような場合にも今回検討した2つのキットが有用であると推測される。

通常の薬剤感受性試験と今回用いた薬剤耐性遺伝子検査キットの比較のため、感受性のはっきりしている培養陽性菌株11例ならびに結核菌標準菌株H37Rvを用いて検証した。すべての菌株で、通常の薬剤感受性試験結果と耐性遺伝子検査キット結果は完全に一致した。これら2つの耐性遺伝子検査キットの有用性が従来の報告^{5,8)}どおり確かめられた。

近年結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析はかなり進められてきたが、いまだすべての変異が解明されていないため、薬剤耐性遺伝子検査キットで検出できない薬剤耐性が存在する。その場合には通常の薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子検査キットの結果に乖離が生じることになる。OligoArray-TBで検出できる抗結核薬耐性遺伝子はRFPでは*rpoB*、INHでは*inhA*、*katG*、SMでは*rrs*、*rpsL*、エタンプトール(EB)では*embB*、カナマイシン(KM)では*rms*であり、それぞれの遺伝子の薬剤耐性関与率は、RFP 95%、INH 80%、SM 80%、EB 70%、KM 70%である。フ

ィノス LiPA Rif TBにおけるRFP耐性の把握率も同様に95%と考えられる。結核菌薬剤耐性遺伝子キットを使用する場合、このような限界をよく理解し結果を解釈する必要がある。最終的な薬剤の選択は臨床経過と各種検査結果を総合的に判断して行わなければならない。

■ まとめ

結核菌培養陰性の喀痰材料2例と、結核菌とNTMの混在菌株2例に、結核菌薬剤耐性遺伝子検査キット(OligoArray-TB、フィノス LiPA Rif TB)による耐性遺伝子変異の検出を試みたところ、4例すべてで迅速に結果が得られた。NTM混在2菌株から後に単一分離した結核菌に対して薬剤感受性試験(ウェルパック、MGIT-AST)を実施したところ、耐性遺伝子検査キットの結果とすべて一致した。培養不能菌、培養速度が極めて遅い菌、NTM混在菌などの薬剤感受性を迅速に推測する必要がある際、両キットは臨床的に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Reisner BS, Gatson AM, Woods GL : Evaluation of mycobacteria growth indicator tubes for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 22 : 325-329, 1995
- 2) Palaci M, Ueki SY, Sato DN, et al : Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 34 : 762-764, 1996
- 3) Musser JM : Antimicrobial agents resistance in mycobacteria : molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 8 : 496-514, 1995
- 4) 鈴木定彦, 田丸亜貴, Amin Ruhul, 他 : 結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析と迅速診断への展開. *防菌防黴* 28 : 561-573, 2000
- 5) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他 : Line Probe Assay (LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核* 75 : 575-581, 2000
- 6) 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
- 7) 阿部千代治 : 第7章薬剤感受性試験. *新結核菌検査指針2000* (日本結核病学会抗酸菌検査法委員会編), pp 95-106, 2000
- 8) 樋口武史, 伏脇猛司, 田中奈加子, 他 : Line Probe Assay (LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌群の喀痰からの直接検出. *結核* 79 : 525-530, 2004
(受稿2005.12.15, 受理2006.2.28)

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 41 (別刷)

呼吸器 6 結核・非結核性抗酸菌症

我が国における最近の動向, 病態

鈴木克洋

最新医学社

第6章

非結核性抗酸菌症

我が国における最近の動向，病態

要旨

非結核性抗酸菌（NTM）とは結核菌以外の培養可能な抗酸菌の総称で，時に肺の慢性感染症を惹起する（肺 NTM 症）．肺 NTM 症の罹患率は最近 20 年間に 6 倍以上増加しており，現在抗酸菌症の 30 % を占めるほどになった．基礎疾患のない中年以降の女性の肺 MAC 症の増加が特に顕著で，その病態解明と治療法開発が急務となっている．

基礎知識

非結核性抗酸菌（NTM）とは結核菌とライ菌以外の抗酸菌の総称であり，現在 100 菌種以上が発見されており，我が国で感染症が報告されているものでも 20 菌種を超えている（表 1）．人間の側から歴史的に考察すると結核菌が典型的な抗酸菌と判断されるため，従来非定型抗酸菌（ATM）と呼ばれてきた．しかし，菌側からみると NTM が一般的かつ普通の抗酸菌であるため，呼び名が変更された経緯がある¹⁾．NTM は土壌，ほこり，水（水道水，風呂などの水まわり，湖沼など）などの自然環境で増殖する環境寄生菌であり，ヒトの体内での増殖は一種の迷入と考えられる．ヒトを中心としたほ乳類の体内でのみ増殖可能な特殊な抗酸菌である結核菌は，自然環境では 24 時間以上は生存できないため，生体材料から 1 コロニーでも検出されれば結核の確定診断となる．一方，NTM は検体へのコンタミや気道への一時的な混入が否定できず，検体から検出されても必ずしも病気とは断定できないため，各種診断基準が設定されている（次項で詳述）²⁾．NTM 症には肺の慢性感染症である肺 NTM 症と，HIV などによる高度の免疫不全に合併した全身播種型 NTM 症がある．本項では日常診療で遭遇する可能性が圧倒的に高い肺 NTM 症を中心に，我が国における最近の動向と病態について述べる．

● キーワード

非結核性抗酸菌
罹患率，
肺 MAC 症
中年以降の女性
M. kansasii 症

我が国における最近の動向

本邦での最近の肺 NTM 症の疫学の特徴を端的に述べると, ① 症例数の絶対的増加, ② *M. kansasii* 症の全国的な発生を始めとする地域差の縮小, ③ 菌種の多様化, ④ 結節・気管支拡張 (中葉・舌区) 型の肺 MAC 症の顕著な増加, の 4 点が挙げられる²⁻⁵⁾. 以下おのこの概略を述べる.

1. 肺 NTM 症の絶対的増加

ヒトからヒトへと感染し公衆衛生上重要な疾患である結核と異なり, 肺 NTM 症の全国規模の統計は全世界的にない. 我が国では旧国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 (国療共研) が所属 15 施設の入院症例を中心に毎年データを集め, 本邦における肺 NTM 症の経年的動向を 30 年以上にわたり検討してきた. 世界に類をみない貴重な研究であったが, 機構改革などのため 1999 年を最後に解散した.

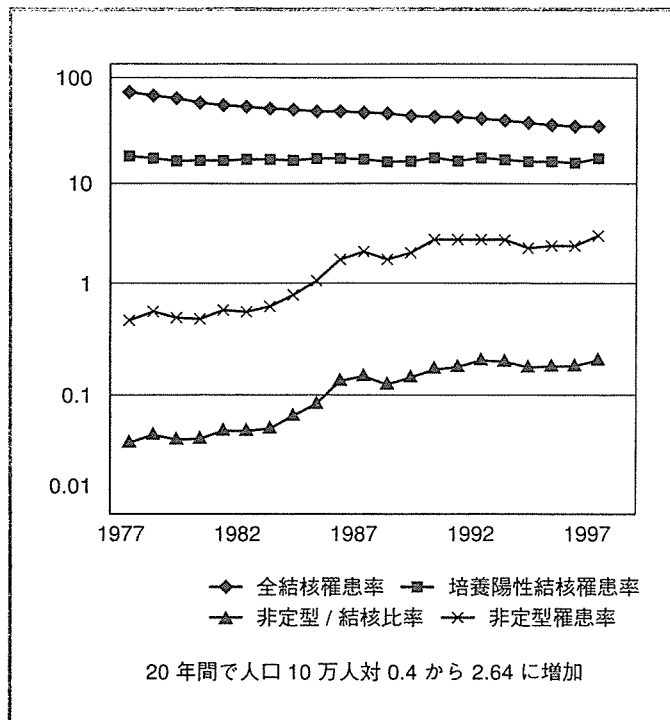
国療共研のデータの推移から我が国における肺 NTM 症の最近の動向を概観してみる. 1977 年から 1997 年までのおおよその推移を図 1 に示す. このデータは調査対象施設での肺結核に対する肺 NTM 症の比率を計算し, 届け出義務があり全国規模での罹患率が判明している肺結核罹患率との積をとることで, 肺 NTM 症の我が国における罹患率を推定したものである. 肺 NTM 症の罹患率の推定値は 20 年間で 10 万対 0.4 から 2.64 へと大幅に増加していることが分かる.

注意すべきは, 旧国立療養所に入院する患者は他の診療施設からの紹介例が多いという点である. 一般の診療施設で肺 NTM 症と判明した場合にはそのまま紹介されない場合もあると考えられるが, 一方結核と判明した場合は必ず紹介されるわけで, 旧国立療養所のデータでは結核が過剰に算定されている可能性が高い. したがって, 療養所以外の第

表 1 我が国で感染症が報告されている非結核性抗酸菌

Runyon 分類 1 群菌	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i>
Runyon 分類 2 群菌	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. lentiflavum</i>
Runyon 分類 3 群菌	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. shimoidei</i> , <i>M. shinshuense</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. intermedium</i> , <i>M. celatum</i>
Runyon 分類 4 群菌	<i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. goodii</i>

図1 結核と非結核性抗酸菌症罹患率の年次推移



一線の病院では、抗酸菌症中に占める肺 NTM 症の割合はさらに高いことが推測される。実際 2001 年に実施された非定型抗酸菌症研究協議会の全国アンケート調査では、結核病床がある病院では抗酸菌症の約 24% が、一方結核病床のない病院では約 40% が、全体では約 29% が肺 NTM 症と報告されている。このアンケートを基にすると年間 8,000 人の新規肺 NTM 症患者が発生していると推計されている⁶⁾。1980 年代後半からの AIDS の世界的流行により、末期感染としての全身播種型 MAC 症が広く本邦の臨床医に

認識されるようになり、またいわゆる結節・気管支拡張（中葉・舌区）型の肺 MAC 症（次項で詳述）の増加が世界的に指摘され、その臨床像や画像所見が 1990 年代になり一般の呼吸器内科医にも知れわたるようになった。さらに、同時期より抗酸菌の検出・同定に分子生物学の手法を応用したキットが広く普及し、専門施設以外の病院でも比較的簡単に NTM の同定が可能になった。このような背景のもと、従来限られた専門施設で診療する特殊な病気であった肺 NTN 症は感染の恐れがなく一般病棟でも診療可能であるため、ある意味では結核以上に一般的な呼吸器感染症となったと言える。

2. *M. kansasii* 症の全国的な発生を始めとする地域差の縮小

国療共研の調査が始まった 1971 年から 1980 年代前半までの肺 NTM 症の発症には地域差が認められ、北海道、東北、北陸地方では少なく、もっぱら東京以西の中日本・西日本で多く報告される疾患であった。中でも *M. kansasii* 症は地域差が強く、1971 年から 1977 までは東京およびその近郊でのみ発生がみられた⁷⁾ が、1978 年から 1980 年代前半になると東京以外に、西日本でも散発的にみられるよ

うになり、特に大阪（中でも近畿中央胸部疾患センターの所在する堺市およびその周辺）では東京以上の発生数を示すようになった。その後 *M. kansasii* 症は全国的に認められるようになり⁷⁾、特に横浜や千葉、岡山では東京に匹敵する発生数を示している。また、1980年代には本症患者のみられなかった札幌でも、1990年代になると毎年新発生がみられるようになった。

1980年代後半になり DNA プローブ法を用いて *M. avium* と *M. intracellulare* の鑑別同定が簡単に行えるようになった。Saito ら⁸⁾ は日本各地の臨床分離 MAC 株を同法により亜分類し、近畿以東の東・北日本では *M. avium* が多数を占めること、中国・四国地方では両者がほぼ同数であること、また九州地方で逆に *M. intracellulare* が多数を占めることを報告している。しかし、先に述べた 2001 年の非定型抗酸菌症研究協議会の検討では同様の傾向はうかがわれるものの、総じて *M. avium* の増加が著しく、九州地区でも両菌の比率がほぼ同数となっている⁹⁾。これは近年急増している結節・気管支拡張（中葉・舌区）型肺 MAC 症の多くが *M. avium* を原因とすることによると推測される（次項で詳述）。

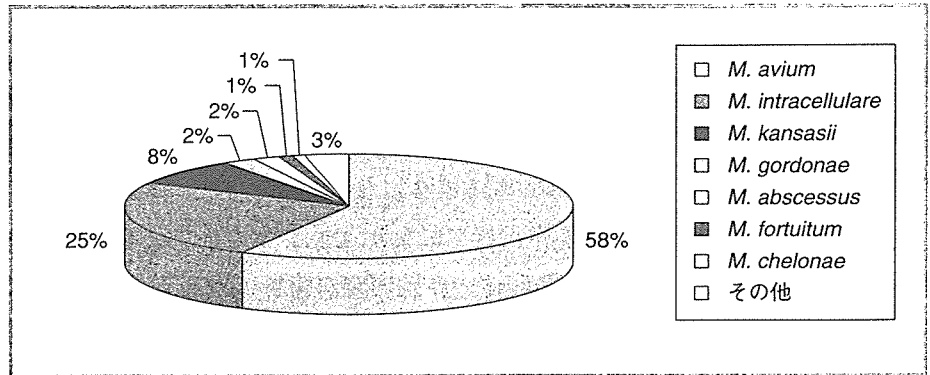
3. 菌種の多様化

従来 NTM の同定は、細菌学的・生化学的に行われていたため特殊な専門施設でのみ可能であった。しかし、1990年代になり、分子生物学を応用した検出・同定キットが普及し、MAC、*M. kansasii* 以外の NTM も含めた菌種の同定が一般病院でも可能となり、各種希少肺 NTM 症の報告が増加している。先述した非定型抗酸菌症研究協議会の調査から、原因菌の割合を図 2 に呈示する。*M. avium* が約 58%、*M. intracellulare* が 25% で、両者併せた MAC 症が全体の約 83% を占めた。*M. kansasii* 症は全体の約 8% で従来の報告より少なく、MAC 症の急増により相対的な地位が低下しているものと推測された。ほかに重要な原因菌として、*M. abscessus*、*M. fortuitum*、*M. gordonae*、*M. chelonae* などが報告されている⁹⁾。さらに、最近では市販の同定キットでは同定できない *M. lentiflavum* や *M. intermedium* などの抗酸菌による感染症も報告されるようになっている。

4. 結節・気管支拡張（中葉・舌区）型の肺 MAC 症の増加

従来肺 MAC 症は陳旧性肺結核・肺気腫などに合併するいわゆる

図2 非結核性抗酸菌原因菌種の割合—非定型抗酸菌症研究協議会による2001年の全国調査の結果（佐藤滋樹：結核・非定型抗酸菌症治療研究会資料より，一部改変）



2次型が多いと言われてきた。1980年代後半になり，特に基礎疾患のない中年以降の女性に発症する肺 MAC 症の増加が米国と我が国で指摘され始めた²⁻⁵⁾。

これは以前から Shimoide により，気管支炎型とか中葉・舌区型とか言われていたものに相当すると思われる⁹⁾が，特に胸部 CT により画像所見が詳細に分析され，中葉・舌区を中心とした肺野末梢の小結節と気管支拡張所見を特徴としているため，結節・気管支拡張（中葉・舌区）型と呼ばれるようになった（図3）¹⁰⁾。一方，従来からの肺 MAC 症は肺結核類似の画像所見をとることが多く，空洞・破壊型と呼ばれている¹⁰⁾。これらの点に関しては次項で詳述されている。

病態

NTM が一般臨床医に知られるようになったのは，AIDS の末期に全身感染症を引き起すことが有名になったからである。高度な細胞性免疫の低下状態を背景に全身播種型の NTM 症が発症することは広く知られている。一方，肺 NTM 症に関しては，陳旧性結核病巣，塵肺，慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの肺局所の感染防御力の低下が重要な発症因子と考えられてきた¹⁰⁾¹¹⁾。殊に肺 *M. kansasii* 症は中年以降の喫煙男性が多く，何らかの粉塵暴露歴を有する例も少なからず存在する¹²⁾。

しかし，1980年代後半より米国で，1990年以降我が国でも，特に基礎疾患のない中年以降の女性の肺 MAC 症の急増が報告されてい