

- ンポジウム I. 結核分子疫学の新展開. 結核. 2006; 81: 694-696.
- (4) Wada T., Maeda S., Hase A., Kobayashi K.: Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat as Molecular Epidemiological Markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: J Med Microbiol. (in press)
2. 学会発表
- (1) 前田伸司. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (2) 村瀬良朗, 大角晃弘, 前田伸司. 東京都から分離された結核菌を用いた分子疫学解析. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (3) 藤原永年, 前田伸司, 小林和夫. 結核菌 *kasB* 遺伝子欠損株のミコール酸生合成と宿主応答. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (4) 鹿住祐子, 村瀬良朗, 前田伸司, 菅原勇, 後藤美江子, 奥村昌夫. VNTR 法による病態別 *M. avium* の分類. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (5) Murase Y., Maeda S., Ohkado A., Uchimura K., Nagamine M., Kato S. Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) for Molecular Typing using *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Tokyo. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (6) Ohkado A., Nagamine M., Murase Y., Uchimura K., Yamada N., Ohmori M., Maeda S., Maeda H., Kato S., Mori T., Ishikawa N. A population-based DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* in an urban area in Japan - Clustering and Homelessness. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (7) Uchimura K., Nagamine M., Ohkado A., Maeda S., Murase Y., Kato S., Mori T., Ishikawa N. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in an Urban Setting in Japan and its Association with Age, Sex and Homelessness. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (8) 藤原永年, 中田登, 前田伸司, 中崇, 矢野郁也, 小林和夫. *Mycobacterium intracellulare* serotype16 由来の特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と合成遺伝子の解析. 第 80 回日本細菌学会総会, 2007 年 3 月, 大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記なし。

資料 1 :

結核菌 DNA 指紋法を用いた新宿区及び川崎市における結核の感染経路に関する研究

大角晃弘

結核予防会結核研究所研究部

研究要旨

わが国の都市部においては、住所不定者やアルコール依存症患者等の保健医療サービスへのアクセスが困難で、更に保健医療サービス受療の中断が頻繁に起こっている集団においては、一般人口集団よりも結核発病の危険性が高いだけでなく、そのような人口集団が比較的多い地域における結核菌の伝播に大きく関与していると推察されている。我々は、標準的結核菌 DNA 指紋型分析法を用いて、東京都新宿区内で新しく登録された全ての結核患者と、川崎市内で新しく登録された結核患者の内川崎市立井田病院から結核菌が分離培養されて患者からの同意書が得られた患者から得られた結核菌の DNA 指紋型分析を実施して、住所不定者等結核発病の危険性の高い結核患者を中心として、それぞれの地域内における結核菌の伝播様式の解析を行った。更に、新宿区内で新しく登録された結核患者から得られた結核菌に対して、IS6110-RFLP 法、スポリゴタイピング法、MIRU-VNTR 法を実施して、IS6110-RFLP 法の代替法である迅速 DNA 指紋法（スポリゴタイピング法及び MIRU-VNTR 法）の菌株鑑別力に関する比較検討を実施した。

2002 年 9 月以降 2006 年 8 月までに新宿区内で培養陽性結核患者として登録されたのは 435 人であった。その内結核研究所に送付されたのは 396 人分の結核菌 396 検体で、汚染等により分析不可能であった 16 人分を除く 380 人分 380 検体についての DNA 指紋法分析を実施した（検体解析率：380 / 435 = 87.4%）。分析対象 380 名の内 108 名が住所不定者であった。DNA 指紋型が完全に一致するクラスターは 47 個検出され、151 人で構成されていた（クラスター形成率：(151-47) / 380 = 27.4%）。この 151 人の結核患者の内 65 人（65 / 151 = 43.0%）が住所不定者であった。クラスター形成率は、住所不定者と一般住民のそれぞれにおいて 39.8%（22 クラスター内で住所不定者が感染源と推定[(65-22) / 108]）及び 22.4%（25 クラスター内で一般住民が感染源と推定[(86-25) / 272]）で、住所不定者のクラスター形成率が有意に高い傾向を認めた（カイ 2 乗=11.76, $p=0.0006$ ）。47 個のクラスター（151 人）の内、一般住民のみで構成されていたのは 12 個（31 人：20.5%）、住所不定者のみで構成されていたのは 7 個（15 人：9.9%）、一般住民と住所不定者の両方で構成されていたのは 28 個（105 人：69.5%）であった。

2004 年 1 月から 2006 年 5 月までに川崎市内で登録された結核患者から回収され、川崎市立井田病院にて分離培養されて、IS6110-RFLP 指紋分析結果が得られた菌株総数は 215 であった。クラスターは 16 個で、1 クラスター当たり平均 3.3 名で、最も大きなクラスターは 10 名であった。クラスターに属する者は 53 名で、クラスター形成率は 17.2% ((53-16) / 215) であった。最も大きなクラスター(Group 40: 10 名)は、川崎市南部に集積し、川崎区（住所不定者含む）と幸区にそれぞれ 3 名、それに隣接する横浜市の鶴見区、港北区と、隣接はしないが横浜市港南区と緑区に各 1 名であった。次に大きなクラスター（Group 28: 6 名）は川崎区から多摩区まで大きく拡がり、1 名は横浜市鶴見区であった。

2004 年 5 月以降 2006 年 4 月までに、上記研究で回収分析された新宿区内で新たに登録さ

れた結核患者から分離培養された結核菌 166 株を対象として IS6110-RFLP 法および迅速 DNA 指紋法を実施した。スポリゴタイピング法による分析の結果、80% (132 / 166) が北京株に属していた。全菌株について RFLP 法と迅速指紋分析法 (16VNTR+スポリゴタイピング) を実施したところ、RFLP 法では 63% (105 / 166) の菌株がユニークな菌株として判別されたが、16 VNTR+スポリゴタイピングでは 48% (79 / 166) がユニークな菌株として判断された。また、形成されたクラスターサイズの内訳をみると、RFLP 法ではより詳細にタイピングされた小さなサイズのクラスター割合が高いのに対し、16 VNTR+スポリゴタイピングではクラスターサイズ 18 といった大きなサイズのクラスター割合が高かった。

A. 研究目的

2006 年の結核の統計では、本邦の 2005 年結核死亡者数は未だ 2,295 人 (結核死亡率人口 10 万対 1.8)、同年新登録全結核患者数は 28,319 人 (罹患率は人口 10 万対 22.2) で、この内 16,313 人 (人口 10 万対 12.8) が菌陽性肺結核患者であった(1)。このように、結核は本邦における感染症の中で、その死亡者数及び罹患率において未だ最大の疾患であり続けている。本邦の特色の一つとして、新登録全結核患者における高齢者の占める割合が全体の高齢化傾向を反映して年々増加していることがあり、2005 年における 70 歳以上の占めるその割合は 44.9% に達している。その一方で、20 歳代における人口 10 万対の全結核罹患率 15.4 (新登録患者数 2,303 人) が、10 歳代のその率 2.6 (新登録患者数は 323 人) に比較して急に高くなっている。また 20 歳代では、感染性の高い喀痰塗抹陽性者が 680 人 (罹患率 4.6) となっており、若年層において結核菌の感染が起こっている事が推定させられる。また病院や老人特別養護施設等の結核菌感染を受け易い人口集団が入居している施設や学校等の若年層が集まる場における結核の集団感染事例が散発しており、近年増加傾向にある (2002 年 37 件、2003 年 41 件、2004 年 45 件)。わが国の都市部における結核は、入国後間もない外国人、高齢者、住所不定者等の結核発病危険集団に集約されてきており(2-4)、住所不定者を対象とする一時宿泊所やサウナ等の限られた空間内における結核の集団発生も認められている(5)。

本研究は、住所不定者結核患者が多く登録されている大都市部 (東京都新宿区及び神奈川県川崎市) において分離培養される全ての結核菌に対して、標準的結核菌 DNA 指紋法である IS6110-RFLP 法を実施して、同地域における結核菌の伝播状況を推定し、同種の菌株が同定された 2 人以上の結核患者から構成されるクラスターが検出された場合に、各患者間の接触状況について疫学的情報を追加することにより、同地域における結核菌伝播の疫学的状況を記述することを目的とする。更に、IS6110-RFLP 法と迅速指紋分析法である VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 法及びスポリゴタイピング法の組み合わせについての比較を行い、RFLP 法の代替手段として迅速指紋分析法を導入することが適切であるか否かを明らかにし、北京株の存在が指紋型の分析に及ぼす影響についても明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象とした結核菌株

i) 新宿区における分子疫学研究

2002年9月以降2006年8月までに、医療機関検査室またはその他の検査機関において、新宿区内で新たに登録された結核患者から分離培養された結核菌を結核研究所に送付し、380人分380菌株を対象として結核菌DNA指紋法を実施した。クラスター形成率の計算は、 $(n - c) / N$ [n: クラスターに所属する患者数、c: クラスターの数、N: 分析実施患者数]とした。

ii) 川崎市における分子疫学研究

2004年1月から2006年5月までに川崎市立井田病院で同意書が得られた結核患者から分離培養されて結核菌DNA指紋法を実施したのは、215人分215菌株であった。クラスター形成率の計算は、 n / N を用いた。

iii) IS6110-RFLP法と迅速DNA指紋法との菌株鑑別力に関する比較検討

2004年5月以降2006年4月までに、新宿区内で新たに登録された166人の結核患者から分離培養された結核菌166株を対象とした。

2) 検体と背景情報の収集（平成15年度報告書にて記載）(6)

3) 結核菌DNAの抽出と精製及びIS6110-RFLP分析法については、平成15年度報告書に記載(6)。また、標準的IS6110-RFLP分析法に関しては、文献(7-8)に従って実施した。IS6110-RFLP分析結果のクラスター解析は、BioNumerics v.3.51, (Applied Maths)を使用し、クラスターに関する判断は、複数の研究協力者による目視によって最終判断し、完全に一致するバンド型によって構成された集団クラスターとした。IS6110-RFLP分析の結果、バンド数が6本未満でクラスターと判定された結核菌株については、2次検査としてスポリゴタイピング法を実施して同一菌株であるか否かを判断した(9)。VNTR法は、日本で標準的に用いられている12箇所のMycobacterium interspersed repetitive units領域(MIRU 2、4、10、16、20、23、24、26、27、31、39、40)と4箇所のExact tandem repeat領域(ETRA、B、C、F)の合計16領域(16VNTR)を対象に実施した(10)。スポリゴタイピング法は、43箇所のスペーサー領域の有無を定法に従い調べた(11)。VNTRとスポリゴタイピングの結果がすべて一致した例をクラスターとした。北京株に属するかどうかの判別はスポリゴタイピングの結果を用いて実施した

4) 疫学情報との比較（平成15年度報告書に記載）(6)。

5) 統計解析

患者情報入力、EpiData version 3.1、統計解析は、EpiData Analysis version 1.1及びStata version 8.1を使用した。2標本の比率比較はカイ2乗検定を行い、期待値が5未満の場合は、フィッシャーの直接確率法に拠った。2標本の平均値比較はスチューデントのt検定に拠った。統計的確率の有意水準は、危険率 $p=0.05$ とした。

6) 住所不定者の定義は、「住所が不定または不安定な状況にある人で、登録時から過去2年以内に次の項目に該当する人を含む：公園、路上、橋の下、川岸等の公共の空間で滞在している人（いわゆる street homeless または rough sleeper）、簡易宿泊所、サウナ、インターネットカフェ等に滞在している人、入院中で居住先が不定な人。

C. 結果

i) 新宿区における分子疫学研究

2002年9月以降2006年8月までの期間内に新宿区内で登録された結核患者から、医療機関検査室またはその他の検査機関において分離培養されて、結核研究所に送付されたのは396人分の396検体であった。その内380人分380検体についてのDNA指紋法分析を実施した(検体解析率: $380 / 435 = 87.4\%$)。分析対象380名の内108名(28.4%)が住所不定者であった。DNA指紋型が完全に一致するクラスターは47個検出され、151人で構成されていた(クラスター形成率: $(151-47) / 380 = 27.4\%$)。この151人の結核患者の内65人($65 / 151 = 43.0\%$)が住所不定者であった。クラスター形成率は、住所不定者と一般住民のそれぞれにおいて39.8%(22クラスター内で住所不定者が感染源と推定[(65-22) / 108])及び22.4%(25クラスター内で一般住民が感染源と推定[(86-25) / 272])で、住所不定者のクラスター形成率が有意に高い傾向を認めた(カイ2乗=11.76, $p=0.0006$)。47個のクラスター(151人)の内、一般住民のみで構成されていたのは12個(31人:20.5%)、住所不定者のみで構成されていたのは7個(15人:9.9%)、一般住民と住所不定者の両方で構成されていたのは28個(105人:69.5%)であった。結核菌DNA指紋型の情報が得られる前に、保健所職員によって同じクラスターに所属することが予想されてDNA指紋型の情報によって支持された例は、17人認められた(この内2人は1本鎖転移例)。更に、いずれかのクラスターに所属する4人の患者において疫学的接触の可能性が考えられた。結核菌DNA指紋型情報によってそれまで判明していなかった接触状況が明らかとなった例は1例のみであった。また、保健所職員によって疫学的接触の可能性が考えられていた8人の患者において、結核菌DNA指紋型情報によって別の菌種であることが判明した。

ii) 川崎市における分子疫学研究

2004年1月から2006年5月までに回収され、IS6110-RFLP指紋分析結果が得られた菌株総数(=患者数)は215であった。クラスターは16個で、1クラスター当たり平均3.3名で、最も大きなクラスターは10名であった。クラスターに属する者は53名で、クラスター形成率は24.7%であった。215名の内川崎市を居住地としていたのは121名、横浜市は69名、その他25名であった。居住地別クラスター形成者はそれぞれ34名(28.1%)、13名(18.8%)、6名(24.0%)であった。215名の内横浜市と川崎区の一部を除く103名(47.9%)について疫学情報を得た。クラスター形成率は、性別では男で83名中23名(27.7%)、女で20名中7名(35.0%)であった。年齢別のクラスター形成率は、59歳以下62名中25名(40.3%)、60歳以上41名中5名(12.2%)であった。疫学情報の中には町名が含まれており町名をもとに検体採取者とクラスター形成者に分布を地図に展開した。最も大きなクラスター(Group 40: 10名, 29-59歳)は、川崎市南部に集積し、川崎区(住不定者含む)と幸区にそれぞれ3名、それに隣接する横浜市の鶴見区、港北区と、隣接はしないが横浜市の港南区と緑区に各1名であった。次に大きなクラスター(Group 28: 6名, 48-63歳)は川崎区から多摩区まで大きく拡がり、1名は横浜市鶴見区であった。次は4名からなるクラスターが2個あり、1つは(Group 32: 4名, 35-49歳)幸区から宮前区まで川崎市の中部に拡がり、1名は横浜市の神奈川区であった。もう一つは(Group 38: 4名, 59-69歳)川崎区3名と多摩川を挟んで隣接する東京都大田区1名で、川崎区内は町名でもかなり地域が限局していた。

iii) IS6110-RFLP法と迅速DNA指紋法との菌株鑑別力に関する比較検討

スポリゴタイピングの結果、調査期間中に分離培養された結核菌の80%(132 / 166)が北京株に属していた。全菌株についてRFLP法と迅速指紋分析法(「16VNTR法+スポリゴタイピング法」)を実施したところ、RFLP法では63%(105 / 166)の菌株がユニークな菌株

として判別されたが、「16 VNTR 法+スポリゴタイピング法」では48% (79 / 166)がユニークな菌株として判断された。また、形成されたクラスターサイズの内訳をみると、RFLP 法ではより詳細にタイピングされた小さなサイズのクラスター割合が高いのに対し、「16 VNTR+スポリゴタイピング法」ではクラスターサイズ 18 といった大きなサイズのクラスター割合が高かった (クラスターサイズの内訳: RFLP は 2 株 14 例、3 株 4 例、4 株 4 例、5 株 1 例、であり、VNTR+スポリゴタイピング法では 2 株 3 例、3 株 5 例、4 株 5 例、5 株 1 例、6 株 1 例、8 株 1 例、9 株 1 例、18 株 1 例)。今回調べた 16 箇所の反復配列多型領域について個々のタイピング能力を解析したところ、タイピング能力の比較的高い領域 (HGDI>0.5) として 2 領域 (MIRU26、MIRU31)、比較的中程度の領域 (0.5>HGDI>0.3) として 7 領域 (MIRU10、MIRU40、ETR A、ETR F、MIRU30、MIRU16、MIRU23)、比較的低い領域 (0.3>HGDI) として 7 領域 (MIRU4、ETR B、ETR C、MIRU27、MIRU20、MIRU24、MIRU2) が分類された。

D. 考察

i) 新宿区における分子疫学研究

住所不定者におけるクラスター形成率が一般住民における率より高い傾向が判明し、住所不定者における結核罹患率が高い状況を考えると、結核感染が住所不定者における集団においてより高頻度に発生している事が示唆された。また、クラスターに所属する結核患者の内 69.5% が一般住民と住所不定者の両方が含まれるクラスターに所属していることと、そのようなクラスターの 1 つに 8 ヶ月乳児が含まれるものが存在していたことから、一般住民集団と住所不定者集団間における結核菌伝播の存在が示唆された。問題点としては、結核患者の登録時点から結核菌 DNA 指紋分析結果が得られるまでに要する時間が長いため (結核菌分離培養 (固形培地) に約 2 ヶ月、IS6110-RFLP 分析及びクラスター分析に約 2 週間、結核研究所で増菌が必要な場合は更に約 1-2 ヶ月)、保健所における接触者検診対象者選定等の一般業務において結核菌 DNA 指紋分析結果を用いるのは困難であった。結核菌 DNA 指紋分析結果を速やかに提供するためには、MGIT 等による液体培地を使用した結核菌の分離培養を行い、VNTR 法等による PCR を用いた迅速結核菌 DNA 指紋法を 1 次的検査として実施することが必要と考えられた。クラスターを形成した結核患者内の 11% (17 / 151) のみで疫学的接触状況が確認され、新たに発見されたのは 1 例のみであった理由として、保健所保健師による疫学情報収集内容の患者間における接触状況検索に関する有用性、クラスターに所属する結核患者への再面接調査の導入の必要性、日本の都市部における現状での疫学的接触状況を把握することの困難性、地域内在型の菌株が存在している影響等の可能性が考えられた。新宿区のような都市部における分子疫学的調査を実施する上での問題点としては、交通機関の発達によって人口移動が容易となり、患者間の接触状況を把握するのが非常に困難であること、また都市部で感染があり、発病後居住地で登録された場合には接触状況の把握が困難であることが考えられる。この結果、クラスター形成率の過小評価をすることになり、首都圏のような人口移動が大きな地域では、広範囲の分子疫学調査を実施することが必要と考えられる。現在、首都圏の複数の地方自治体が協力して広範囲での結核菌分子疫学調査を開始するための準備を進めている。

ii) 川崎市における分子疫学研究

分析対象者 215 名については都市と区まで全員についての情報が得られたが、性・年齢等の情報は、103 名 (47.9%) について得られただけで、分析結果への影響は否定できない。全員の情報が得られる市および区でクラスター (4 名以上) の地域集積性をみると、川崎市南部の川崎区に限局しているもの、川崎区と幸区を中心に広がっているもの、川崎市全

域に広がっているものと地域集積性には特徴が見られた。今後は、さらに疫学情報の収集率を高め、結核感染状況について検討する予定である。

iii) IS6110-RFLP 法と迅速 DNA 指紋法との菌株鑑別力に関する比較検討

「VNTR 法+スポリゴタイピング法」のタイピング能力が低い原因として、北京株のタイピングに問題があることが挙げられる。たとえば、北京株に属さない菌株では 91% (31 / 34) がユニークな菌株としてタイピングされたのに対し、北京株でユニークとされた菌株はわずか 36% (48 / 132)であった。また、「VNTR 法+スポリゴタイピング法」で生じた最大サイズのクラスター(n=18)はすべて北京株に属しており、関西地区で分離された北京株でも主要な遺伝子型として存在することが明らかとなった。これらの結果は、今回用いた迅速指紋型分析法を日本全国で適用する場合の問題点を示唆しており、その方法の改善には北京株に対するタイピング能力の向上が重要であると考えられた。また、VNTR 法のタイピング能力を改善するためには、タイピング能力の低い領域に変えて、タイピング能力の高いその他の新しい領域を組み合わせることが必要であると考えられた。

E. 結論

i) 新宿区における分子疫学研究

新宿区で登録される住所不定者の中で一般住民よりも結核菌の伝播がより頻繁に発生していること、住所不定者と一般住民の間における結核菌の伝播も起こっていることが推定され、都市部における住所不定者を含めた結核対策をより強化することが必要と考えられた。新宿区におけるより効率的な結核対策を実施する上での基礎資料を提供した。

ii) 川崎市における分子疫学研究

全員の情報が得られる市および区でクラスターに所属することが明らかにクラスター（4名以上）の地域集積性をみると、川崎市南部の川崎区に限局しているもの、川崎区と幸区を中心に広がっているもの、川崎市全域に広がっているものと地域集積性には特徴が見られ、川崎市における今後の結核対策を実施する上での基礎資料を提供した。

iii) IS6110-RFLP 法と迅速 DNA 指紋法との菌株鑑別力に関する比較検討

現状では、今回用いた迅速指紋分析法である VNTR とスポリゴタイピングの併用は、RFLP と比べて明らかにタイピング能力が劣っており、RFLP 法の代替法としてタイピング能力の点で不十分であることが示された。迅速指紋分析法のタイピング能力を RFLP と同程度以上に改善するためには、特に北京株に対してタイピング能力の高い VNTR 領域を導入することが適切であると考えられるので、現在 RFLP と同様のタイピング能力を有するような VNTR 領域の組み合わせについて検討中である。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

H. 2006 年度 (2006 年 4 月以降 2007 年 3 月まで)研究発表

1. 論文発表等

(1) 前田伸司. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 結核 2006;81:694-696.

2. 学会発表等

- (1) Ohkado A., Nagamine M., Murase Y., et al. A population-based DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* in an urban area in Japan - A preliminary report on the clustering and the homelessness -. Tuberculosis Surveillance Research Unit (TSRU), April 5-7 2006, Beijing.
- (2) 前田伸司. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月 27-28 日, 仙台市.
- (3) 村瀬良朗, 大角晃弘, 前田伸司. 東京都から分離された結核菌を用いた分子疫学解析. 第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月 27-28 日, 仙台市.
- (4) 大森正子. 川崎市における結核の感染経路に関する経過報告. 川崎市井田病院結核菌 RFLP 分析調査報告会, 2006 年 5 月 8 日, 川崎市.
- (5) 長嶺路子, 神楽岡澄, 田原なるみ他. 新宿区における IS6110RFLP 解析に基づく結核の伝播状況の推測とその対策. 第 65 回日本公衆衛生学会総会. 2006 年 10 月 25-27 日. 富山市.
- (6) 大角晃弘. 結核集団感染対策における結核菌 DNA 指紋法の応用. 第 65 回日本公衆衛生学会総会自由集会. 2006 年 10 月 25 日. 富山市.
- (7) Ohkado A., Nagamine M., Murase Y., et al. A population-based DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* in an urban area in Japan - Clustering and Homelessness -. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (8) Murase Y., Maeda S., Ohkado A., et al. Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) for Molecular Typing using *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Tokyo. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (9) Uchimura K., Nagamine M., Ohkado A. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in an Urban Setting in Japan and its Association with Age, Sex and Homelessness. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.

参考文献

1. 財団法人結核予防会. 結核の統計 2006 年版. 財団法人結核予防会. 2006.
2. 重藤えり子, 佐藤裕恵, 重藤紀和, 他. 南米出身労働者を中心としておきた結核の集団発生. 結核 1995; 70:13-20.
3. 田丸垂貴, 鈴木定彦. RFLP 分析による結核小規模感染事例の疫学的研究. 結核 1999; 74:555-561.
4. 佐々木結花, 山岸文雄, 水谷文雄, 他. 中高年者を中心に生じた多剤耐性結核菌による集団感染事例. 結核 1999; 74:549-553.
5. 中西好子, 大山雄, 高橋光良, 他. サウナでの結核多発の分子疫学的解明—大都市のホームレスの結核問題に関連して— 日公衛誌 1997;44:769-777.
6. 厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 都市部における一般対策の及ぶにくい特定集団に対する効果的な感染症対策に関する研究 平成 15 年度 総括・分担研究報告書. 主任研究者石川信克. 2004 年 3 月. p.159-186.
7. Van Embden, J.D.A., Cave, M.D., Crawford, J.T., et al. Strain identification of

- Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31:406-409.
8. Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukasawa, Y., et al. Restriction Fragment Length polymorphism Analysis of Epidemiologically Related *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. Microbiol. Immunol. 1993; 37:289-294.
 9. Burman, W.J., Reves, R.R., Hawkes, A.P., et al. DNA Fingerprinting with Two Probes Decreases Clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 1140-1146.
 10. Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 1998; 144: 1189-1196.
 11. Kamberbeek, J., Shouls, L., Kolk, A., et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. JCM 1997;35:907-914.

謝辞

本研究に協力して頂いた新宿区内の医療・検査機関及び川崎市立井田病院の関係者の皆様に深謝いたします。

<研究協力者>

村瀬良朗、内村和広、山田紀男、大森正子、加藤誠也、石川信克（結核予防会結核研究所）
長嶺路子、辰巳由里子（東京都新宿区保健所）
前田秀雄（東京都健康安全研究センター）

結核菌に関する研究班
薬剤耐性の迅速診断法の開発に関する研究

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

研究要旨

結核菌の薬剤感受性試験は数週間を要し、これに代わる迅速な診断法の開発とその臨床応用が急務となっている。これまでに、単一操作により抗結核剤 7 剤の耐性に関与する遺伝子全てをわずか 45 分間でかつ一度に PCR 増幅する方法及びその塩基配列を解析することを可能とする方法（上記ダイレクトシーケンス法:特開 2004-215542）を開発した。本年度は、本技術を用いて結核菌臨床分離株の薬剤耐性に関与する変異についての基礎情報を蓄積し、変異と薬剤耐性との関連を検証した。又、これによって得られた情報を基にし、上記の PCR 法と新たな検出系としてラインプローブ法を組み合わせることで、臨床検査室で実用可能な抗結核薬耐性に関与する遺伝子変異を検出する新たな診断法の開発に取り組んだ。特に本年度はニプロ株式会社と共同で開発したピラジナミド耐性結核菌診断(特開 2006-180746 及び特開 2006-180753)の為の試作品の検討を推進した。

A. 研究目的

本研究では、多剤耐性結核患者の迅速診断を可能にする方法の開発を行なう。幸い結核菌は全ゲノム配列が明らかにされており、またその薬剤耐性機構は比較的限定した遺伝子の変異であることが知られている。従って、多剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発は大変有望な方法であると期待される。当センター病院とも共同で臨床応用を進め、本診断法の有用性を実証し、多剤耐性結核菌の蔓延防止に寄与することを目的とした。具体的には、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を行なう。さらに、より簡便な迅速診断法の開発を推進し、ダイレクトシーケンス法で用いた耐性遺伝子 PCR 増幅法とその知見に基づき、ピラジナミド耐性遺伝子内変異検出のための簡便法（ラインプローブ法）をニプロ株式会社と共同で開発する。本年度はその試作品の検討を推進した。

B. 研究方法

国立国際医療センターなど医療施設から分離された結核菌または患者喀痰を前処理し DNA

抽出した。菌体由来 DNA の抽出には CTAB 法を、喀痰由来には ChelexTM 100 resin を使用した。また、ラインプローブ法の感度検査には、喀痰直接煮沸法による抽出 DNA を使用した。
<ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核迅速診断法>

(1-1)PCR :8 本の PCR チューブを用いて、抽出した結核菌ゲノム DNA を鋳型とし、耐性遺伝子に特異な 8 組のプライマーペアを用いて PCR による薬剤耐性遺伝子を全て同じコンディションで増幅した。プライマーは、RIF 耐性遺伝子 (*rpoB*)、INH 耐性遺伝子 (*katG* 及び *mab-inhA*)、EMB 耐性遺伝子 (*embB*)、PZA 耐性遺伝子 (*pncA*)、AGs 耐性遺伝子 (*rpsL* 及び *rrs*)、FQs 耐性遺伝子 (*gyrA*) を増幅するように設計した。PCR 産物はそれぞれ MicroSpinTM Columns (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

(1-2)塩基配列の決定：シーケンス反応は、BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いたダイターミネーター法にて行った。シーケンス反应用プレミックスに、それぞれ 1 μ l の PCR 産物、塩基配列決定用に設計したプライマーを加え反応させた後、未反応 Dye 及び過剰プライマーの除去後、96 ウェルプレートに入れ、16 本キャピラリー式 ABI 3100 オートシーケンサーを用いて泳動した。

(1-3)塩基配列の解析：塩基配列の解析及び編集は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer software を用い、これらを既知の薬剤感受性 *M. tuberculosis* H37Rv 株の塩基配列と比較することにより、変異の有無を解析した。

<変異と薬剤耐性の関連検証>

結核菌の INH 耐性が、菌体内での INH の酸化と関連することが明らかにされている。そこで、カタラーゼ・ペルオキシダーゼ (INH を酸化する) をコードする遺伝子内に変異を有する *katG* 遺伝子を単離し、これを大腸菌内で発現させ、INH の酸化能を測定した。

結核菌の PZA 耐性が、菌株が産生するピラジナミダーゼ活性の消失と関連することが明らかにされている。そこで、ピラジナミダーゼをコードする *pncA* 遺伝子内に変異を有する株のピラジナミダーゼ活性を測定した。方法は Wayne, L.G. の方法 (Am. Rev. Respir. Dis. 109:147-151) に従って実施した。

<ラインプローブ法による PZA 耐性遺伝子内変異検出のための簡便法>

本法は、ビオチン加プライマーを用いて結核菌より抽出・PCR 増幅された PZA 耐性関連遺伝子 *pncA* を、数種類のプローブを固相化した

ストリップにハイブリダイズさせ、遺伝子内の変異を検出する方法である。酵素反応により *pncA* 遺伝子内の各部位が結合したプローブのみ発色する。

(2-1)プローブの設計と固相化

結核菌の *pncA* 遺伝子の全長をカバーし、結核菌 DNA と結合する為に必要なハイブリ温度がほぼ一定になるように、数種類のプローブを設計した。これをストリップに固相化した。

(2-2) ハイブリダイゼーション

上記プローブが固定されているストリップにビオチン化増幅 DNA を結合させた。

(2-3) 変異の検出

アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、これに基質を加え発色させた。

(倫理面への配慮)

研究対象は患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する

C. 研究結果

ダイレクトシーケンス法により、主要抗結核剤 4 剤を含む 7 剤の耐性遺伝子の変異の有無を解析した。同時に従来の薬剤感受性試験も実施した。調べた臨床分離株 138 株中 83 株は全ての薬剤に感受性であったが、これらの株の中にも、アミノ酸置換を伴う変異を有する株が存在したが、その変異の多くが、既知の多型であった。INH 耐性株 38 株中 34 株 (89.5%)、RIF 耐性 28 株中 28 株 (100%)、PZA 耐性株 17 株中全て (100%)、EB 耐性株 18 株中 15 株 (83.3%)、SM 耐性株 30 中 18 株 (60.0%)、LVFX 耐性株 3 株中全てに耐性遺伝子に変異が認められた。上記に認めた変異保有株と薬剤耐性の関連を

表1に示した。薬剤感受性菌にも変異が存在することから、引き続き同定された変異が薬剤耐性と関連するかどうかを確定することが必要である。実際、INH耐性に関与する*katG*遺伝子を単離し、その発現産物であるカタラーゼ・ペルオキシダーゼのINH酸化能を測定した結果、5種類の異なる変異体ではINH耐性を裏付けるINH酸化能の低下及び消失が観察されたが、3種類の異なる変異体では、顕著なINH酸化能の低下及び消失が観察されなかった(図1)。*pncA*遺伝子内変異保有株については、ピラジナミダーゼ活性の有無を検査した結果、アミノ酸置換を伴う変異を有する株全てが、ピラジナミダーゼ活性を消失していた。そこで、PZA耐性については、ダイレクトシーケンス法の最も重要な発見であるPCR増幅法と、ハイブリダイゼーション(ラインプローブ法)と組み合わせたピラジナミド耐性に関する迅速診断法を開発し、その有効性を検討した。臨床分離株258株中、サイレント変異を含め39株がピラジナミド耐性遺伝子*pncA*内に変異を有していた。内、6株が新規の変異を保有していた。変異保有株を含む258株を用いてラインインプローブ法を実施した結果、全ての変異が検出可能であった。

D. 考察

本研究では、以下の抗結核薬の耐性に関与する遺伝子、*rpoB* (RIF)、*katG*と*inhA* (INH)、*pncA* (PZA)、*embB* (EMB)、*rpsL*と*rrs* (AGs)、及び*gyrA* (FQs)の耐性に関与する領域すべてを一回の操作でPCR増幅しその塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法を開発し、臨床分離株138株を用いた検討を実施した。その結果、一回の操作で主要抗結核剤4剤を含む7剤の耐性遺伝子全てをPCR増幅することが可能となり、しかも6.5時間で広範な耐性関連領域の塩基配列を速や

かに増幅し、解析することが出来るようになった。患者喀痰からの直接診断も可能とであった。しかし、本方法の短所として、必要なシーケンサーが高価であり、検査室への導入が難しいことがあげられる。そこで、本技術の最も重要な発見である耐性遺伝子PCR増幅法と、ハイブリダイゼーション(ラインプローブ法)と組み合わせたPZA耐性に関する迅速診断法を開発した。その変異を迅速に検出する為のストリップ摸式図を図3に示した。結果、本ラインインプローブ法にて全ての*pncA*遺伝子内変異保有株が変異検出可能であった。ダイレクトシーケンス法による変異解析の結果、*pncA*遺伝子内にもサイレント変異が存在することが明らかとなったので、このサイレント変異を補正する為のプローブを設計した結果、アミノ酸置換を伴う変異を有する株のみを検出することが可能となった。これらのアミノ酸置換を伴う変異を有する株は、PZA耐性を示唆するピラジナミダーゼ活性の消失が認められた。なお、臨床分離株を用いた開発製品の実施例のいくつかを示した。(図4)。

一回の操作で主要抗結核剤4剤を含む7剤の耐性遺伝子全てをPCR増幅する技術と、ハイブリダイゼーション(ラインプローブ法)と組み合わせた迅速診断法は、薬剤耐性結核の迅速診断法として有望であることが明らかとなった。現在、INH、SM、KM、FQsの耐性を判別する為のラインプローブ法を開発している。

E. 結論

本研究では、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発を推進すると共に、これらの結果を発展させ、ピラジナミド耐性遺伝子検出のための簡便法(ラインプローブ法)をニプロ株式会社と共同で開発した。本年度は試作品の検討を推進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, Kirikae T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45:179-192.
2. Huang Q, Tonge PJ, Slayden RA, Kirikae T, Ojima I. FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2007; 7:527-543.

2. 学会発表

1. 関口純一郎、中村友彦、末竹寿紀、切替富美子、秋山 徹、切替照雄：ラインプローブ法によるピラジナミド耐性結核菌の検出法の開発. 第 89 回日本細菌学会関東支部総会. 2006 年、渋川.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録、その他

なし

TABLE 1. Nucleotide and amino acid changes found in 138 clinical isolates of *M. tuberculosis*

Gene	No. of isolates (n=138)	Isolate origin	Changes		% Resistant (No. of isolate displaying resistance)	Other mutations
			Nucleotide	Amino acid (silent mutation)		
<i>rpoB</i> ^a	83	Japan	None	None	0	
	26	Poland	None	None	0	
	1	Japan	TCG→TTG	S450L*	0	
	1	Poland	CAA→CTA	Q513L	100	
	1	Japan	GAC→GTC	D516V	100	
	1	Japan	TCG→TTG	S522L	100	
	1	Japan	CAC→TAC	H526Y	100	
	2	Japan	CAC→CGC	H526R	100	
	1	Poland	CAC→ACC	H526T	100	
	7	Japan	TCG→TTG	S531L	100	
	5	Japan	TCG→TGG	S531W	100	
	5	Poland	TCG→TTG	S531L	100	
	2	Japan	AGC→AGG and CAC→CGC	S509R* and H526R	100	
	2	Japan	ATG→ATT and GAC→TAC	M515I and D516Y	100	
<i>katG</i>	14	Japan	None	None	0	
	23	Poland	None	None	4.4 (1)	
	1	Japan	CTG→TTG	(L653L)	0	
	1	Japan	GCC→ACC	A65T*	0	
	1	Japan	GCG→CTG	A245V*	0	
	1	Poland	CAG→CCG	Q295P*	100	
	1	Poland	GGC→GTC	G297V*	100	
	4	Japan	AGC→ACC	S315T	100	
	2	Japan	AGC→AAC	S315N	100	
	3	Poland	AGC→ACC	S315T	100	
	1	Japan	GTC→GCC	V725A*	0	
	63	Japan	CGG→CTG	R463L	3.2 (2)	
	2	Japan	CGG→CTG	R463L	100	-15C→T upstream of <i>mabA</i>
	1	Poland	ACC→CCC	T324P*	100	-15C→T upstream of <i>mabA</i>
	7	Japan	AGC→ACC and CGG→CTG	S315T and R463L	100	
	2	Japan	TTG→TTC and CGG→CTG	L141F* and R463L	100	
	1	Japan	ATG→ACG and CGG→CTG	M257T* and R463L	100	-5T→A* upstream of <i>mabA</i>
	1	Japan	CTG→CAG and CGG→CTG	L48Q* and R463L	100	-15C→T upstream of <i>mabA</i>
	1	Japan	ATG→ACG, CGG→CTG and GTC→GCC	M257T* and R463L and V708P*	100	-15C→T upstream of <i>mabA</i>
2	Japan	CTA insertion at position 1170	L390 insertion*	100		
<i>mabA-inhA</i> operon ^b	97	Japan	None	-	0	
	29	Poland	None	-	3.4 (1)	
	2	Japan	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	R463L in <i>katG</i>
	1	Poland	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	T324P* in <i>katG</i>
	1	Japan	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	L48Q* and R463L in <i>katG</i>
	1	Japan	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	M257T*, R463L and V708P* in <i>katG</i>
	1	Japan	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	
	4	Poland	-15C→T upstream of <i>mabA</i>	-	100	
	1	Japan	-8T→A upstream of <i>mabA</i>	-	100	
1	Japan	-5T→A* upstream of <i>mabA</i>	-	100	M257T* and R463L in <i>katG</i>	
<i>embB</i>	77	Japan	None	None	0	
	30	Poland	None	None	3.3 (1)	
	2	Japan	GAC→GAT	(D345D)	100 (2)	
	1	Japan	GAC→GAT	(D534D)	0	
	5	Japan	ATG→GTG	M306V	100	
	1	Japan	ATG→ATT	M306I	100	
	1	Japan	ATG→ATC	M306I	100	
	2	Poland	ATG→ATA	M306I	100	
	2	Japan	GAC→GCC	D354A*	100	
	4	Japan	GAG→GCC	E378A	0	
	1	Japan	GTG→TTG	V492L*	0	
	1	Poland	CAG→CGG	Q497R	100	
	2	Japan	GCC→ACC	A680T*	0	
	3	Japan	GCC→GTC	A1007V*	0	
	1	Japan	GAC→AAC	D1024N	0	
	2	Japan	CTG→CTA and GAG→GCG	(L355L) and E378A	0	
	1	Japan	AAT→TAT and ATG→ATA	N296Y* and M306I	100	
2	Japan	ATG→CTG and GAG→GCG and CCC→CCA	M306L and E378A and (P1075P)	100		

TABLE 1. - continued

<i>pncA</i>	89	Japan	None	None	0		
	30	Poland	None	None	0		
	2	Japan	TCC→TCT	(S65S)	0		
	1	Japan	GCG→GAG	A3E*	100		
	1	Poland	CAG→CCG	Q10P	100		
	1	Japan	GAC→GCC	D12A	100		
	2	Japan	CAC→CAA	H51Q	100		
	1	Poland	CAC→CAG	H51Q	100		
	3	Japan	CCG→CTG	P54L*	100		
	1	Japan	TGC→TGG	C72W*	100		
	2	Japan	GGT→AGT	G132S	100		
	2	Japan	ATT→ACT	I133T	100		
	1	Poland	CGC→AGC	R148S	100		
	1	Japan	ATG→GTG	M175V*	100		
	1	Japan	GAC→AAC	D53N*	100		
	<i>gyrA</i>	7	Japan	GAG→CAG	E21Q*	0	
		11	Poland	GAG→CAG	E21Q*	0	
95		Japan	GAG→CAG and AGC→ACC	E21Q* and S95T	0		
22		Poland	GAG→CAG and AGC→ACC	E21Q* and S95T	0		
1		Japan	GAG→CAG, GAC→GGC and AGC→ACC	E21Q* and D94G and S95T	100		
1		Japan	GAG→CAG, GCG→GTG and AGC→ACC	E21Q* and A90V and S95T	100		
1		Japan	GAG→CAG, GCG→GTG, GAC→GCC and AGC→ACC	E21Q* and A90V and D94A and S95T	100		
<i>rpsL</i>	87	Japan	AAA→AAG	(K121K)	11.5 (10)		
	33	Poland	AAA→AAG	(K121K)	6.1 (2)		
	2	Japan	AAA→AAG	(K121K)	100	516C→T in <i>rrs</i>	
	1	Japan	AAA→AAG	(K121K)	100	1,061C insertion* in <i>rrs</i>	
	1	Japan	AAA→AAG	(K121K)	100	1,400A→G in <i>rrs</i>	
	1	Japan	AAA→AAG	(K121K)	100	1,400A→G and 1539A→G in <i>rrs</i>	
	13	Japan	AAG→AGG and AAA→AAG	K43R and (K121K)	100		
<i>rrs</i>	33	Poland	None		6.1 (2)	(K121K) in <i>rpsL</i>	
	87	Japan	None		11.5 (10)	(K121K) in <i>rpsL</i>	
	13	Japan	None		100	K43R and (K121K) in <i>rpsL</i>	
	2	Japan	516C→T		100	(K121K) in <i>rpsL</i>	
	1	Japan	1,061C insertion*		100	(K121K) in <i>rpsL</i>	
	1	Japan	1,400A→G		100	(K121K) in <i>rpsL</i>	
	1	Japan	1,400A→G and 1539A→G		100	(K121K) in <i>rpsL</i>	

^aCodon numbering system of RpoB initially described by Telenti et al. was used. The codon numbers of RpoB are designated on the basis of alignment of translated *E. coli rpoB* sequence with a portion of translated *M. tuberculosis rpoB* sequence and are not the positions of the actual *M. tuberculosis rpoB* codons.

^bNucleotide numbering based on nucleotide position relative to *mabA* start codon.

*Mutation not previously reported.

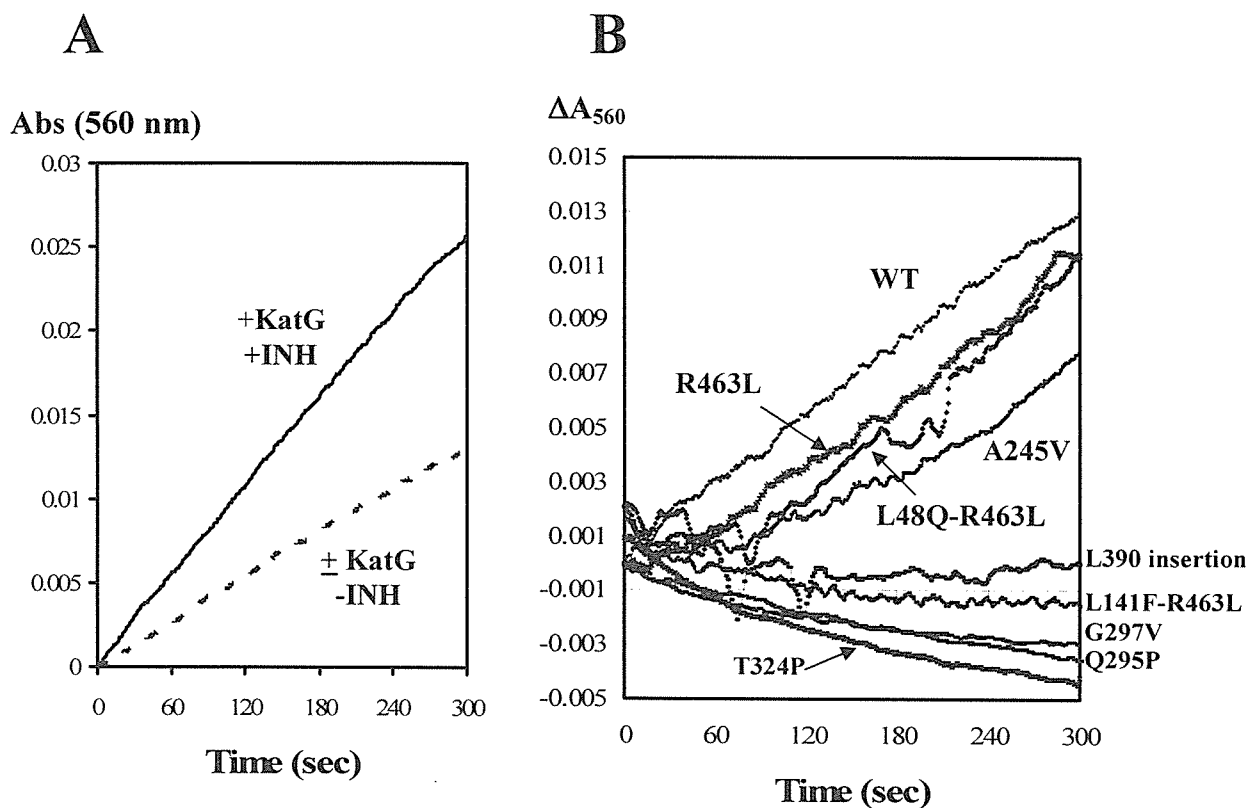


図 1. KatG の INH の酸化に伴う NBT の還元の時時的観察。(A) KatG による INH の酸化(NBT の還元)。INH 非存在下でも NBT が還元される。(B) INH 非存在下での、NBT の還元を差し引いた INH の真の酸化経過。図中の数字は KatG の変異部位を示す。INH 耐性菌より単離した KatG 変異体 (L390 insertion, L141F-R463, G297V, Q295P, T324P) では、INH の酸化が認められない。一方、KatG 変異体 (R463, L48Q-R463, A245V) では、顕著な NH の酸化が認められない。

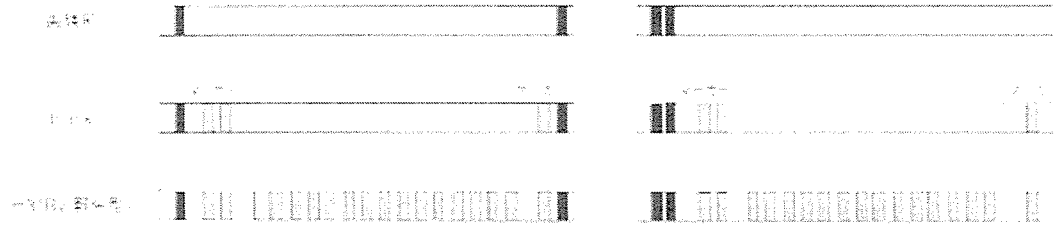


図 3. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出ストリップ模式図(NIPRO 社との共同開発製品)

PZA 耐性菌の *pncA* 遺伝子内変異部位を検出するプローブを、2 枚のストリップに配置。野生型全てのストリップが発色するが耐性菌が保有する遺伝子内変異箇所は発色しない。

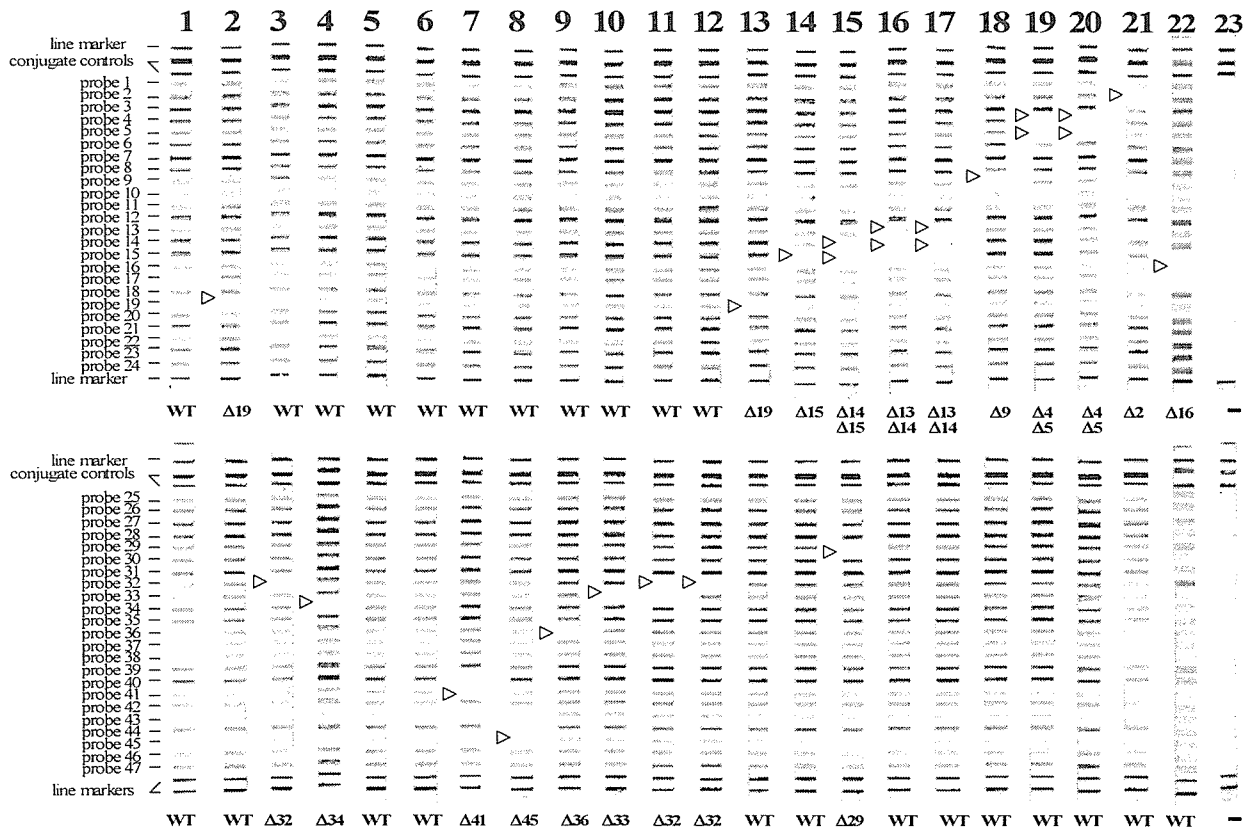


図 4. 結核菌の薬剤耐性関連変異迅速検出キット(NIPRO 社との共同開発製品) の実施例

矢印で示す PZA 耐性菌の *pncA* 遺伝子の変異部位に相当するプローブは発色しない。

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, et al	Detection of Multidrug Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	J Clin Microbiol	45(1)	179-192	2007
Huang Q, Tonge PJ, Slayden RA, et al	FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery	Curr Top Med Chem	7(5)	527-543	2007

精度管理と定点監視体制の確立

分担研究者 御手洗 聡
財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌レフェレンスセンター

研究要旨

日本は現在でも結核の罹患率が22.2（2005年）/10万であり、結核中蔓延国である。抗酸菌検査は結核診断のゴールドスタンダードであり、年間100～200万件の実施があると思われる。抗酸菌検査は結果の与える公衆衛生学的インパクトが大きいと、高い精度が要求されるが、それを体系的に保証するシステムは存在しない。我々は日本結核病学会とも連携して検査精度保証の現状と課題、その解決法について検討した。

外部精度保証の具体的方法として、人工痰による塗抹検査と、薬剤感受性検査のパネルテストについて検討した。人工喀痰については、大規模精度保証活動に用いることを想定して、各検査室でスライドを準備した場合の精度と長期保持性を検討し、同一陽性度ではスライド間で一致しており、少なくとも4°Cで6ヶ月保存可能であることを示した。薬剤感受性検査については、これまでの方法を改善して被験菌株を10株とし、参加証を発行したことにより、精度評価に支障を来さずにパネルテストへの参加を拡大することが可能であった。しかしながら、定点観測体制を確立するには十分な精度を有する施設の確保が不十分であり、引き続き外部精度評価活動とともに、具体的改善活動が必要と考えられた。培養・同定検査に関しては、菌種の選定などの準備は進んだが、パネルテストとして実施するには適切な基質が必要であり、アルカリ分解性などの性質を備えた人工痰の開発が必要と考えられた。

内部精度管理について実施したアンケートからは、安全キャビネットの普及が進んでいるものの、検査室の整備が不十分であり、さらなる安全への配慮が必要と考えられた。また、マニュアルの整備や機器の保守の面では比較的良好であるが、実際の検査の精度管理は実践が不十分であることが示された。これは人員の不足や方法論の不備、精度管理に対する認識（法的背景を含む）不足によるものであり、特に病院検査室の精度管理体制の整備が必要と考えられた。

A. 研究目的

抗酸菌検査は複雑であり、検査件数の減少に伴って精度を維持することが困難となっている。しかし、検査の結果は結核診断のゴールドスタンダードであり、治療法の選択や治療効果の評価にも用いられ、臨床

的・社会的な重要性が高い。故に外的評価等で検査精度を保証することが必要となる。特に薬剤感受性検査の精度保証は、治療成功や耐性菌発生の防止の意味でも重要である。

結核研究所では、これまで日本結核病学会と共同で結核菌薬剤感受性検査の外部精度評価を進めてきた。この結核菌検査の精度保証方式を拡大し、検査精度認定システムを構築することが第一である。これで認定された検査施設の所見に基づく薬剤耐性の全国的サーベイランス体制が確立されれば、現在およそ5年おきに実施されている断面調査（結核療法研究協議会による全国結核菌薬剤耐性サーベイ）の反復を代替することも可能となる。

同時に、抗酸菌塗抹、培養、同定検査についても精度保証が必要であるが、我々が先に開発した人工痰以外に適切な材料がないのが問題である。人工痰の性状をさらに分析し、培養・同定検査パネルテストの実施のための準備も行うことを目的とした。

また、我々は2002年度に全国の抗酸菌検査施設を対象に、抗酸菌検査の実施状況に関するアンケート調査を実施したが、既に5年が経過しており、この間に新しい検査法の導入等が進んでいることを考慮し、精度管理を中心とした検査の情報を更新する目的でアンケート調査も実施した。

B. 研究方法

1. 抗結核薬薬剤感受性検査外部精度評価

【目的】結核菌の薬剤感受性検査における検査精度を評価し、認証する。

【方法】

参加施設：

結核菌薬剤感受性試験を実施している病院検査室あるいは検査センター全てを対象とする。基本的には参加は任意であり、「日本結核病学会理事長」および「抗酸菌検査法検討委員会委員長」名による本調査への

参加依頼をプロトコールとともに送付し、諾とした施設のみに試験用の検体を送付する。尚、検体の送付やデータの取りまとめ・解析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が行う。

送付する検体（結核菌株）：

結核菌10株を小川培地上に発育した状態で送付する。今回送付する菌株はSupra-national 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を用いる。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・耐性を判定する。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が割り振られており、全ての結果はこの番号によって分類される。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。検体は平成18年8月下旬から9月上旬に発送する。

試験薬剤：

検査薬剤は、結果の安定性を考慮してIsoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)およびStreptomycin (SM)とする。尚、INHについては基準濃度(0.2 μ g/ml)の結果のみとする。

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う。調査用紙に感受性試験に関するいくつかの事項を記入し、検査結果とともにコーディネーター宛報告する。結果の返送：

薬剤感受性試験のコーディネーターへの報告は被験菌受領から3ヶ月以内とする。やむを得ず3ヶ月を越える場合には前以て