

6. Expansion of DOTS Japanese Version and its Perspective: Toru MORI (Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases)

When the condition of tuberculosis treatment is becoming unfavorable year by year in Japan, the expansion of the quality DOTS is badly needed. The DOTS should be the kernel of the Japan's NTP that would be enhanced by the Stop TB Japan Partnership, involving wide variety of related organizations, and all the categories of health-related professions. In this way, Japan could share the global effort toward the Millennium Development Goals following the roadmap by the Stop TB Strategy.

Key words: Nursing, Coordination, DOTS

¹Iwate Prefectural Central Hospital, ²Department Faculty of Nursing & Social Welfare Science, Fukui Prefectural University

Correspondence to: Keiko Kokubu, Department Faculty of Nursing & Social Welfare Science, Fukui Prefectural University, 4-1-1, Matsuoka-kenjojima, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1195 Japan. (E-mail: kokubu@fpu.ac.jp)

3. 肺カンサシ症の治療

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，内科

鈴木 克洋，吉田志緒美，露口 一成，源 誠二郎，
井上 義一，林 清二，岡田 全司，坂谷 光則

はじめに

肺 *M. kansasii* (カンサシ) 症は，わが国の肺非結核性

抗酸菌症の第2位の頻度を占める重要疾患である¹⁾²⁾。
近年非結核性抗酸菌症の相対的かつ絶対的増加が内外で
報告されている。しかし肺カンサシ症は1990年代後半

以降わが国での発生頻度は横ばいで、MAC症の引き続き増加によってその相対的地位の低下が報告されている³⁾。当院は全国的に見て、肺カンサシ症例が最も多い病院の一つであり、90年代後半以降年間60例以上を経験してきた。当院でのデータを中心に、肺カンサシ症の臨床像と治療につき概観したい。

方 法

2001年から2004年まで、当院に入院した肺カンサシ症のうちデータが把握できた190例を対象とした。また結核や肺MAC症との比較は、2003年の66例を用いた。当院の抗酸菌症データベースより年齢、性別、喫煙歴、基礎・合併疾患、治療薬、排菌陰性化までの日数、入院中死亡率等を検討した。

結 果

2003年に入院した抗酸菌症938例の26%が非結核性抗酸菌症であり、そのなかの27% (66例) が肺カンサシ症であった。男性が73%、女性が27%、喫煙者が69%、非喫煙者が31%を占めた。年齢は20代から90代まで、中間値は58歳で、結核の61歳、MAC症の72歳より若い傾向であった。2001年から2004年の190例の基礎疾患と合併症を検討した。特になしが44例、消化性潰瘍が34例、陳旧性肺結核が25例、慢性肝障害が24例であり、糖尿病は16例 (8.4%) であった (図1)。ちなみに2003年に肺結核で入院した638症例の糖尿病合併率は15%である。

治療薬剤が判明した155例の内訳は、INH+RFP+EBまたは類似処方⁸⁾が84例、CAM+RFP+EBまたはその類似処方⁹⁾が39例、levofloxacin (LVFX) +その他の抗菌薬が22例であり、CAMやLVFXを含む治療が41%を占めていた (図2)。排菌陰性化までの期間は、どの治療群でも30日前後とほぼ同等であった。190例中69例 (36.3%) で何らかの副作用が生じ、皮疹、発熱、肝障害、視力障害等が多かった (図3)。1997年から2004年までに当院で検出し薬剤感受性検査が行われた567カンサシ株中、RFP耐性は4株 (0.71%) にすぎなかった。190例の入院中死亡はわずか1例 (0.53%) であり、当院での結核入院中死亡率の平均6.3%より大幅に少なかった。

考 案

従来日本での肺カンサシ症は肺非結核性抗酸菌症の15~20%を占めると報告されてきたが¹⁾²⁾、1990年以降その発生は横ばいで、MAC症の急速な増加により相対的な地位は低下傾向である。実際2001年の非定型抗酸菌症研究協議会の全国調査では8.1%まで低下している³⁾。以前より肺カンサシ症の発生には地域格差が大き

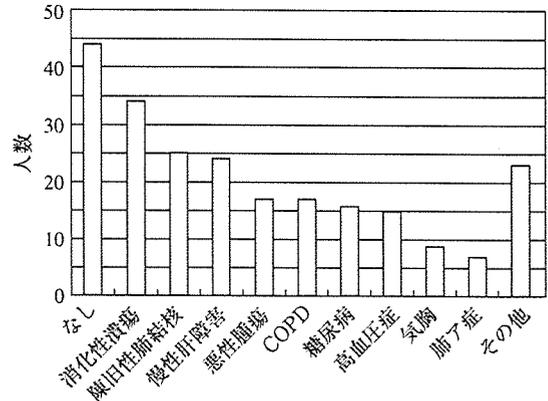


図1 肺カンサシ症の基礎疾患・合併症

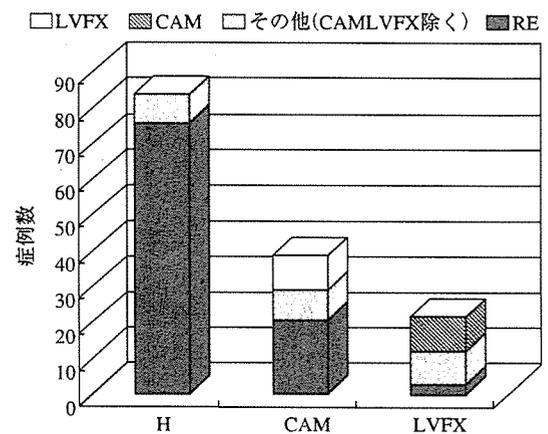


図2 肺カンサシ症の治療薬剤 (2001~2004)

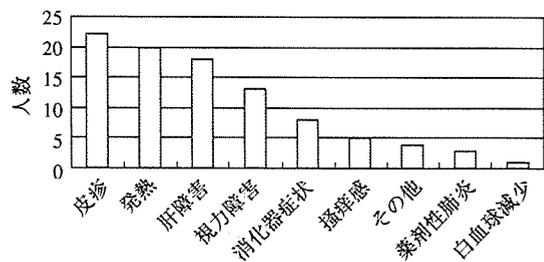


図3 肺カンサシ症治療中の薬剤副作用

いことが知られている。70年代までは東京近郊のみで発生し、80年代になり近畿以西にも広がり、90年代以降は全国的な発生が報告されている⁴⁾⁵⁾。しかし現在でも、東京、大阪近郊での発生が多い疾患である。当院は肺カンサシ症を年間60例以上経験する本邦でも随一の施設である。製鉄業を含む堺臨海工業地帯を背景とする地域環境がその一因であると推定される。

肺カンサシ症は40代以後の喫煙男性に圧倒的に多く、男女比は10:1と記載されている報告が多い⁴⁾⁵⁾。しかし

当院での最近の症例を検討すると、男女比は約7:3であり、若年の非喫煙女性や高齢の女性での発症も決して珍しくなくなっている。基礎疾患や合併症として従来、陳旧性肺結核、塵肺、COPD等が代表的であったが⁵⁾、今回の検討では消化性潰瘍や慢性肝障害の合併も多かった。

カンサシは非結核性抗酸菌の中では毒性が強く、混入が少なく、無治療では悪化する例が多いので、細菌学的診断基準が緩くかつ診断した例は治療するのが原則である¹⁾⁶⁾⁷⁾。唯一化学療法で治せる非結核性抗酸菌症であると言っても過言ではなく、通常INH+RFP+EBを12~18カ月投与すれば、ほとんどの症例が再発なく改善すると言われている。一般に結核菌用の薬剤感受性検査を非結核性抗酸菌に応用しても臨床的には無益であると考えられているが、カンサシのRFP感受性だけは例外となっている。まれに存在するRFP耐性菌の場合、治療にはアミノグリコシド、CAM、ニューキノロン等も加えて治療する。ただし当院で1997~2004年に検出したカンサシ567株中RFP耐性であったのはわずか4株にすぎない。今回の検討では、CAMやLVFXを使用している例が41%存在した。その理由の大部分は、RFP耐性ではなく各種副作用のためINH+RFP+EBという標準的な治療ができないことであった。

CAMやニューキノロンのカンサシに対する試験管内での有効性はしばしば報告されているが、臨床データは乏しい。GriffithらはCAM+RFP+EBの間欠投与を18

人の肺カンサシ症例に実施し、平均13カ月間の治療が完了した14例では、平均1カ月で排菌停止し、平均48カ月の観察期間中1例の再発もないと報告している⁸⁾。今回の検討も含め、両薬剤の臨床効果は十分期待できるものと推測される。

文 献

- 1) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会：非定型抗酸菌症の治療に関する見解—1998年。結核。1998；73：599-605。
- 2) 坂谷光則：非定型抗酸菌症の疫学と臨床。結核。1999；74：377-384。
- 3) 佐藤滋樹，坂谷光則，倉島篤行，他：肺非結核性抗酸菌症の診断と治療。呼吸。2005；24：106-117。
- 4) Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, et al.: Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. Am Rev Respir Dis. 1988；137：1280-1284。
- 5) 水谷清二：特に *M. kansasii* 症について。化学療法の領域。1999；15：728-732。
- 6) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997；156：S1-S25。
- 7) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会：肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年。結核。2003；78：569-572。
- 8) Griffith DE, et al.: Thrice weekly clarithromycin-containing regimen for treatment of *Mycobacterium kansasii* lung disease: results of a preliminary study. CID. 2003；37：1178-1182。

4. 診療所における非結核性抗酸菌症の治療と管理

水谷内科呼吸器科クリニック 水谷 清二

1. はじめに

かつて非結核性抗酸菌症 (NTM 症) は抗酸菌塗抹または培養が陽性であるがために結核専門施設に患者が集中し、一般病院の呼吸器外来でさえ稀な疾患であった。しかし診断技術の進歩を背景に本症に関する理解が広がり、昨今では一般呼吸器外来ではよく知られた疾患の一つになっている。ヒトへの感染が否定的である本症であれば、今後は地域の中での診療需要が拡大するものと思われ診療所でも受け入れ態勢の確立が求められる。本稿では診療所における本症の治療と管理の問題を提起してみたい。

2. NTM 症患者と結核患者の混合収容

過去の NTM 症患者の多くは結核感染後の治療果での

局所免疫低下を基礎に発病していた (結核後遺症型)。このため結核菌に対する細胞性免疫が維持されており、このタイプの NTM 症患者が結核病棟に混合収容されても、結核院内感染が問題となることは稀であった。結核治療歴はなくとも老人は結核既感染者が多かった事実も混合収容を可能にしていた。しかし、昨今 NTM 症患者の発症年齢が低下しつつあり、本症患者を単に抗酸菌陽性を根拠として結核病棟に混合収容した場合での結核院内感染の発生につき懸念が生じている。NTM 症感染が同時に結核感染に対しても免疫付与すればよいのであるが、十分とするデータはない。従って、現在の取り扱いには、NTM 症と判明すれば一般病棟に入院とし、菌種不明の場合、結核病棟に入院させるか否かは臨床症状や核酸増幅法の結果次第とするのが現実的である。すなわち、早期菌種同定こそ重要である。

ゆえに結核病棟内での再感染が判明した事実をもとに、国内外の文献の考察も含め、宿主側の因子、菌側の因子および結核菌の再曝露程度により、外来性再感染が普遍的に起こり得ることを、分子疫学的解析により実証し

た。低蔓延国に近づいている本邦では、外来性再感染は結核入院病棟を中心に起こるので、これを意識した入院患者・職員への感染防止対策が必要であることを各演者は警告した。

1. 多剤耐性結核の再感染

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 露口 一成, 吉田志緒美, 鈴木 克洋
岡田 全司, 坂谷 光則

はじめに

わが国の結核医療は、長年にわたってそのほとんどが隔離入院治療という形で行われてきた。しかし、結核病棟が特に他の一般病棟と比べて特別な感染対策が施されていたわけではなく、空気感染防止のための空調管理設備を備えた病室が整備され始めたのもごく近年のことである。結核病室の多くは大部屋であり、感受性結核患者と耐性結核患者が同室となることも多かった。これは、①結核患者が新たに他の結核菌の感染を受ける(再感染)ことは稀である、②耐性結核菌は変異菌であるので毒力は弱い、という漠然とした認識があったからと考えられる。すなわち、感受性結核患者が耐性結核菌の外来性再感染を受けることはまずあり得ないと想定されていたのである。

しかし近年分子疫学の進歩により結核の再感染発病を確実に証明することが可能となり、耐性結核菌による再感染発病が起こり得ることも報告されている。ここでは、われわれが経験した多剤耐性結核菌による再感染発病と考えられる2事例について既述し、今後の結核感染対策のあり方について考えてみたい。

事例 1

本事例は多剤耐性結核の院内集団感染事例である。初発患者 A は56歳の男性で、平成12年3月発症の初回多剤耐性結核患者である。発症時の分離結核菌の薬剤感受性検査で isoniazid (INH), rifampicin (RFP) を含む多剤に既に耐性を示しており、近医入院にて化学療法を施行されるも大量排菌持続していた。平成14年6月に他患者とのトラブルのため当院転院となる。

当院転院までの約2年間における患者 A の接触者から後に5名の多剤耐性結核患者が発生し、5名の分離菌株は RFLP 分析により患者 A の菌株と同一であると考えられた。うち3名は特に基礎疾患のない若年女性であった。他の2名は63歳男性と53歳男性であり、基礎疾患として肺気腫、糖尿病を有していた。2名とも全剤感受

性肺結核にて入院加療を受けており、入院中にのみ患者 A と接触歴があった。2名とも感受性肺結核治療後に多剤耐性肺結核を発症している。従って感受性結核罹患中に多剤耐性結核菌の再感染を受けたと考えられる。なお、2名とも感受性肺結核罹患時の分離菌は保存されておらず、RFLP 分析は行えなかった。本事例の患者は6名全員 HIV 陰性であった。

事例 2

本事例は当院で経験した多剤耐性結核菌による再感染発病事例である。患者 X は特に基礎疾患を有さない28歳男性で、平成13年1月より全剤感受性結核にて当院入院し化学療法を行った。入院中の一時期、多剤耐性肺結核に罹患していた患者 Y と同室であった。順調に排菌陰性化して退院し、化学療法にて治療に至ったが、その後、平成16年6月に再発し、そのときの検出菌の薬剤感受性検査では INH, RFP, ethambutol (EB), streptomycin (SM) を含む多剤に対して耐性を示していた。RFLP 分析を行ったところ、再発時の検出菌は初回治療時の検出菌とはパターンが異なっており、患者 Y の検出菌と同一パターンであった。すなわち、感受性結核治療中に多剤耐性結核菌の再感染を生じて、後に多剤耐性結核による再発を生じたと考えられた。なお、患者 X も HIV 陰性であった。

多剤耐性結核菌のクラスター解析

2001年から2004年までに当院で分離した多剤耐性結核菌株115株を対象に、RFLP法、spoligotyping法により解析を行った。RFLP法では48株(42%)が10群のクラスターを形成していた。5株以上からなる大きなクラスターが3群あり、クラスター a (12株)、クラスター b (11株)、クラスター c (7株)とした。事例1の株はクラスター c、事例2の株はクラスター a に属していた。spoligotyping法でクラスター a、クラスター b は Beijing strain と判定されたが、クラスター c は Beijing strain ではなかった。

多剤耐性結核は、一般にはその多くが不十分な治療による耐性の誘導が原因と考えられているので、クラスター形成率は低くなることが予想される。しかし、今回の検討ではクラスター形成率は42%であった。また、大きなクラスターを形成するクラスター a, b, c の株は、広く蔓延する強毒株であることが示唆された。

再発時に多剤耐性を示した結核における再感染の頻度

当院において、いったん結核にて化学療法を行い治療した後、少なくとも排菌陰性期間が6カ月以上持続した後に多剤耐性結核を発症した例につき、前後の菌株が入手できた8症例に対してRFLP分析を行った。8例中6例は前後の菌株のRFLPパターンが一致し内因性再燃であると考えられたが、残り2例(事例2を含む)はパターンが異なり再感染発病であると考えられた。この2例の再発時の耐性菌はクラスター a (事例2) とクラスター c に属する大クラスター形成株であった。

考 察

近年 RFLP をはじめとする分子疫学的手法の進歩により結核の再感染発病について幅広い検討がなされている。当初は HIV 感染者での報告が相次ぎ、再感染発病の宿主側の危険因子として HIV 感染が注目されたが、その後 HIV 陰性者を含めて様々な状況下での再感染発病事例が報告された。伊藤はこれまでの報告の分析により、かつて考えられていたほど再感染発病は稀なものではなく、宿主側の因子、菌側の因子および曝露程度により普遍的に起こり得ることを指摘している¹⁾。

今回の事例1では、2年間に基礎疾患をもたない若年女性3人が発病し、また、2人の中高年男性が再感染を受けて発病している。また、事例2では基礎疾患をもたない HIV 陰性若年男性が再感染を受けて発病している。以上よりこの2事例の菌は強毒菌であったことがうかがわれる。いずれも大きなクラスターを形成する菌であったこともその裏付けとなる。

かつて動物実験でカタラーゼ活性を欠く INH 耐性菌の増殖が感受性菌に比べて劣ることが示されたことから、変異株である耐性菌は感受性菌に比べて毒力が弱いと漠然と信じられてきた。しかし、今回われわれが経験したように、多剤耐性結核菌といえども再感染発病を引き起こす病原性の高い菌も存在する。それでは、病原性を規定するものは何であろうか? Niemann や Narvskaya も HIV 陰性者における多剤耐性結核再感染事例を報告しており²⁾³⁾、いずれも菌は Beijing strain であった。欧米では、集団感染や再感染発病の原因となる強毒菌として Beijing strain が関与しているとの報告が多い⁴⁾。しかし、

わが国や中国ではもともと半数以上が Beijing strain である⁵⁾。一方、事例1の菌は Beijing strain ではなかった。結局、Beijing strain であることも必ずしも決め手とはならず、現時点で菌の病原性を決定するのは困難であると言わざるを得ない。あえて言えば、クラスター解析で大きなクラスターを形成する菌が強毒菌であるとも言えるかもしれない。

多剤耐性結核の再感染は、結核の感染対策上大きな影響を与える。多剤耐性結核菌による再感染が起こり得、しかもどの菌が再感染し得るか予測することが不可能な以上、すべての排菌陽性耐性結核患者は感受性結核患者と同室に収容すべきではない。さらに、初回耐性結核の可能性も考えると、感受性不明の排菌陽性結核患者は全員陰圧個室収容が望ましい。CDCの結核院内感染防止ガイドラインではこの点を考慮に入れ、薬剤感受性パターンが同一であると判明し有効な化学療法が行われている場合に限り患者同士を同室にしてよいとしている⁶⁾。わが国の現状では、これを守るのはインフラの面からもコストの面からもきわめて困難である。しかし、結核患者の減少、在院日数の短縮化により結核病棟の稼働率が下がっていく中で、思い切った対策の転換を考慮する必要があるのではないだろうか。多剤耐性結核は、その医療にかかる金銭的・時間的コストの膨大さ、さらに、院内感染が生じたときの社会的なインパクトの大きさなどを考慮に入れると、その発生防止に最善の対策が講じられるべきである。

文 献

- 1) 伊藤邦彦: HIV 陰性者における結核の外來性再感染発病. 結核. 2005; 80: 365-379.
- 2) Niemann S, Richter E, Rüsche-Gerdes S, et al.: Double infection with a resistant and multidrug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 548-551.
- 3) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, et al.: Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21: 596-602.
- 4) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al.: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 843-849.
- 5) Qian L, Abe C, Lin TP, et al.: rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1091-1094.
- 6) CDC: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Facilities. MMWR. 1994; 43, RR-13.

4. 多剤耐性結核菌の院内感染の現状と対策

鈴木 克洋^{*1)} 吉田 志緒美^{*} 露口 一成^{*} 岡田 全司^{*2)} 坂谷 光則^{*3)}

我が国の結核病棟における感染対策はほとんどなされて来なかった。その理由は、以下のドグマが支配的であったためと思われる。① 結核病棟の医療従事者の大半は結核に感染している、② 結核の再感染はない、③ 多剤耐性結核菌の感染力は極めて弱い。最近 10 年間でこれらのドグマはすべて否定された。我々は多剤耐性結核の院内集団感染事例を報告した。この中には 2 例全剤感受性結核治療中の患者が含まれている。薬剤効果が乏しくいつまでも排菌が続く多剤耐性結核はむしろ感染しやすいと考えなければならない。少なくとも多剤耐性結核患者は衛生工学的対策が完備した個室で治療し、通常の結核患者との接触を極力避ける必要がある。

Key Words : 多剤耐性結核 / 院内感染 / 再感染 / 感染力 / 毒力

I はじめに

我が国において結核の院内感染対策が論じられるようになったのは、1990 年代の後半からである。今や感染対策の象徴的存在である N-95 微粒子マスクが臨床現場に導入されたのも 90 年代後半以降であり、それまでの結核病棟ではガーゼマスクを使用するのが普通であった。結核の専門家といわれる医師でも、飛沫感染と飛沫核(空気)感染の違いすら知らなかった当時の状況が窺われる。結核対策といえば、患者をとにかく結核病棟(多くは近隣の国立療養所)に移送することであり、結核病棟での感染対策は全く考慮されていなかったといっても過言ではない。特に多剤耐性結核(MDRTB)は感染しないとの根強いドグマのもと、通常の結核患者を MDRTB 患者と長期間同室させることになんら痛痒を感じなかったのが我が国の実態であった。

本稿では結核院内感染対策の基本を述べ、我が

国で対策がほとんどなされてこなかった理由を考察し、ついで我々が経験した MDRTB 院内集団感染事例の概要を説明し、さらに MDRTB 菌株の分子疫学的解析から示唆される今後の方向性について述べる。

II 結核院内感染対策の基本と我が国での従来の考え方

結核の院内感染対策は、① マニュアルの作成、職員の教育や健康診断、患者への外科マスクの装着や優先診察などの制度的対策、② 空気管理を中心とした衛生工学的対策、③ 微粒子マスクの装着、BCG 接種、化学予防などの職員の個人的対策の 3 層構造から成立しており(図 1)^{1, 2)}、先に述べた事項がより基礎的かつ重要であると考えられている。

結核の最大の特徴は、飛沫核(空気)感染でヒトからヒトへと伝播することである。基本的に治療可能であるにもかかわらず、現在も結核が社会的

Nosocomial infection of multidrug-resistant tuberculosis : present status and preventive strategy

* Katsuhiko Suzuki, Shiomi Yoshida, Kazunari Tsuyuguchi, Masaji Okada, Mitsunori Sakatani

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター ¹⁾ 臨床研究センター感染症研究部長 ²⁾ 臨床研究センター長 ³⁾ 院長

(1691) 45

特集 多剤耐性結核の現状と今後

に重要視されている所以である。結核罹患率の低下に伴い、結核の見逃しから院内感染を生じた場合の社会的な風当たりはむしろ強まっている。喀痰塗抹(ガフキー)陽性の結核患者が咳をしたときなどに生じる飛沫は短期間で床に沈下するが、一部の飛沫は床に達するまでに表面の水分が蒸発して裸の飛沫核となる(図2)。一般に結核菌を2~3個含んで空気中を長期間浮遊しているこの飛沫核を直接肺胞内に吸い込むことが結核感染の必要

条件である。従って室内から飛沫核を大気中に拡散除去するのが基本的対策となる。また空気の流れによっては患者との直接の面識がなくても感染する危険性があり、空気の流れの管理が重要である(だから空気感染とも呼ぶ)。

1990年代前半まで我が国の結核病棟では上記対策がほとんどなされていなかった。その理由の一部は次のようなドグマが信じられてきたためであると推察される。①成人の大半、特に結核患者を扱ってきた医療従事者は既に結核に感染している、②結核の再感染はない、③MDRTBは感染しない。加えて通常の薬剤感受性結核であれば、たとえ感染・発病しても内服治療のみで簡単に治療できるとの意識も働いていたものと思われる。

しかし1990年代よりHIV(human immunodeficiency virus)感染に合併したMDRTBの高い致死率と医療従事者への感染の実態が欧米から報告されるようになり、我が国でも結核院内感染対策の重要性が認識されるようになった。さらにRFLP(restriction fragment length polymorphism)法による結核の分子疫学的手法が確立することで、健常者での結核再感染の事実が複数報告されるようになり、ドグマの一つが明確に否定

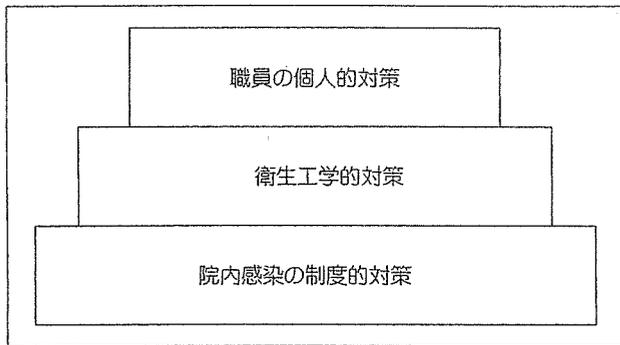


図1 結核院内感染対策の構成

結核の院内感染対策は、①マニュアルの作成、職員の教育や健康診断、患者への外科マスクの装着や優先診察などの制度的対策、②空気管理を中心とした衛生工学的対策、③微粒子マスクの装着、BCG接種、化学予防などの職員の個人的対策の3層構造から成立している。

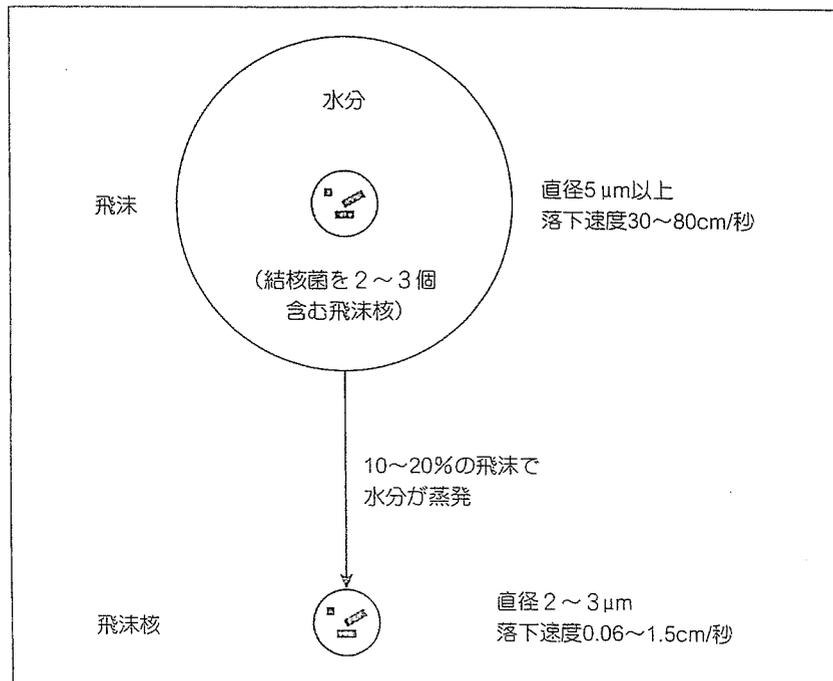


図2 結核の飛沫核(空気)感染

結核患者が咳をしたときなどに生じる飛沫は短期間で床に沈下するが、一部の飛沫は床に達するまでに表面の水分が蒸発して裸の飛沫核となる。

された。同時期より BCG を広範に接種してきた我が国ではツベルクリン反応で結核感染の有無を判定することが極めて難しいこと、また推定結核感染率が以外に低いこと(20歳で1.3%, 30歳で3.1%, 40歳で8.5%程度)も周知されるようになった。結核を扱う医療従事者は一般に強いツベルクリン反応を示すが、BCG 免疫がブースター効果で増強されているに過ぎないことも多いとの認識が広まり、医療従事者の大半は結核に感染しているというドグマも否定された。最後のドグマも次項で述べる事例などを通して現在では否定されている。

III MDRTB の院内集団感染事例

二つの結核療養所を舞台に、1人のMDRTB患者から2人の感受性結核治療中の患者と2人の医療従事者と1人の家族に集団感染を生じた事例である。これら6人の患者中5人が当センターに同時に入院となったことをきっかけとして集団感染が発見された。5人の薬剤感受性結果が同じ(EVM [enviomycin]とCS [cycloserine]以外の全ての薬剤に耐性)であり、またお互いに顔見知りであったことより、他の1人の菌株も取り寄せてRFLPをしたところ同一のパターンを示した。この6人は全員HIV陰性である。この事例に関しては既に概要を報告し^{3, 4)}、さらに詳細を原著として投稿中である⁵⁾。この事例は、「MDRTBは感染力が弱い」、「結核の再感染はない」という二つのドグマを同時に否定している点が大きな特徴である。感受性結核治療中の2人の患者は、発端者と接触後最も早くMDRTBを発病し、かつ進行も早かった。結核の再感染はないという考えを捨ててシンプルに考えると、感受性結核治療中の患者は二重の意味でMDRTBの再(重)感染を受け発病しやすいことが理解できる。①もともと結核の感染・発病を生じやすい理由がある(だから結核になっている、本事例では両者とも糖尿病があった)、②標準化学療法を受けているのでそれらに耐性のあるMDRTBの増殖にはむしろ有利に働く(抗菌スペクトラムの広いセフェム系の薬剤投与中にMRSA [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*] 感染が生じやすいのと同じ理屈)。

4. 多剤耐性結核菌の院内感染の現状と対策

欧米では同様の重感染事例が既に複数発表されており^{6, 7)}、1994年に発表されたCDC (Centers for Disease Control and Prevention) のガイドライン⁸⁾でも、薬剤感受性パターンが同一であると判明し有効な化学療法が行われている場合以外は、複数の排菌陽性結核患者を同じ部屋に収容してはならないと記載されている。つまり、全てのガフキー陽性結核患者は薬剤感受性結果が判明するまで個室に収容しなければならないことになる。しかし、我が国の結核病棟の現状ではどうも無理な要求である。MDRTBとはっきりしている患者だけは空気管理のできた個室に収容し、感受性結核患者との接触を避けることが、現状で精一杯の対策である。結核医療は感染対策というファクターが加わるため、通常の疾患よりコストがかかるというのが世界の常識である。しかし、我が国で結核医療に支払われるコストは通常の疾患よりも大幅に少ないため現状でも赤字であり、結核病棟を持つ病院にインフラを整備する金銭的な余裕はない。厚生労働省や地方自治体からの支援が待たれるところである。

IV 保存結核菌株に対する分子疫学的分析から見えてくるもの

2001年から2004年までに当センターで分離したMDRTB115株に対してRFLP分析を施行し、2株以上に同一パターンを持つ株(クラスター株)の割合(クラスター率)を検討するとともに、スポリゴタイピング法により世界的に毒力が強く集団感染を起こしやすいといわれているBeijing strainの割合を計算した。同じ分析を2003年に分離した全剤感受性結核菌株にも行いMDRTBと比較した。これらの検討結果は原著として現在投稿中である⁹⁾。本稿ではその概要を述べるとともにその結果が示唆するものを考察したい。

MDRTB48株が10群のクラスターを形成し(クラスター率44%)、最大のクラスターは12株からなり、11株からなるクラスターと7株からなるクラスターが続いた。12株と11株からなるクラスターはBeijing strainと判明したが、7株からなるクラスターはBeijing strainではなかった。ちなみに先述した院内集団感染事例は7株か

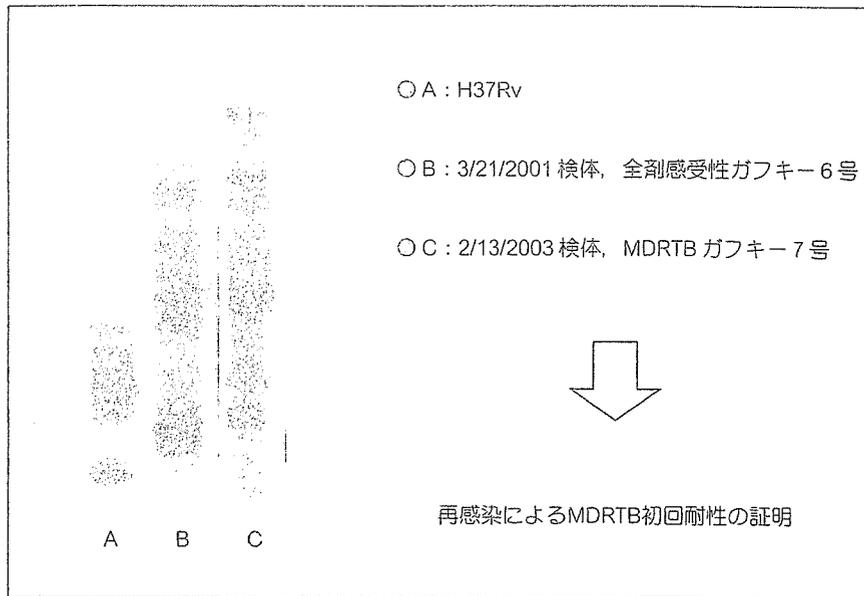


図3 再治療例だが再感染による初回 MDRTB 例

再治療 MDRTB の一部に獲得耐性ではなく再感染による初回耐性が存在し、その中に院内感染が否定できない例が少なからず存在する感触がある。

らなるクラスターに属していた。MDRTB 株全体では 76.1%が Beijing strain であった。一方全剤感受性結核では、94 株が 19 種類のクラスターを形成し(クラスター率 41%)、Beijing strain の割合は 79.8%であった。

以上クラスター率、Beijing strain の割合ともに MDRTB と全在感受性菌で有意差がなく、両者の感染様式に大きな違いはない可能性が示唆された。MDRTB の中には感染力が強くクラスターを作る株がある。一方全剤感受性結核の中にも感染力が弱い株がある。現時点では菌株から直接に感染力・毒力を推測する方法はなく、多数菌株を集めた結果として大きなクラスターを形成している株が感染力・毒力が強いと判定するしかない。しかし、病院ごとまたは地区ごとにこのような分析をしておけば、新たに分離した菌株の感染性・毒力のある程度推定することが可能となる。特に喀痰から直接結核菌の型別が可能な VNTR (variable numbers of tandem repeats) 法を用いれば、迅速に薬剤感受性や感染性の推測が可能になるといわれている¹⁰⁾。

話を院内感染に絞れば、強力な化学療法で急速に排菌量と感染性が低下する全剤感受性結核に比べて、有効な治療法がないため長期間にわたり多量排菌が続く MDRTB の感染性がより高いと判

断すべきである。全剤感受性結核のほとんどは家庭、学校、職場など市中での感染である。一方、再治療 MDRTB の一部に獲得耐性ではなく再感染による初回耐性が存在し、その中に院内感染が否定できない例が少なからず存在する感触がある。通常の結核に標準化学療法を行い治癒した後、6 か月以上過ぎて MDRTB を発症した症例の中で、前後の菌株が入手可能であった 8 例中 2 例で再感染が証明されたのは一つの根拠である(図 3)⁴⁾。1990 年代まで多剤耐性結核と一般の結核を同室で治療するのが一般的であった事実も考慮すると、我々が報告した院内集団感染事例が例外的と簡単に決め付けることは危険であろう。今後、広範囲にかつ網羅的に MDRTB 菌株に対する分子疫学的解析を行うとともに、クラスターを形成している患者間の接触についての疫学的解析を加える必要がある。これは一病院でできることではなく、保健所を中心とした行政が行うべき重要課題である。

V おわりに

分子疫学的手法を始めとする技術革新が結核における長年のドグマを打破した。人間は先入観にとらわれやすく、たやすく根拠のないドグマに支配される。特に結核のような古い病気の場合、た

くさんの症例を経験してきた先輩医師から伝えられる「伝説」に基づいた医療が横行しやすい。「伝説」のみで結核を知ったつもりになり片手間で結核医療を行う医師も存在する。結核の再感染はある。MDRTB はむしろ感染しやすく、特に結核治療中の患者への院内感染には十分注意する必要がある。これらの事実は技術革新もさることながら、結核患者が激減したために見えてきたことでもある。MDRTB に関する新たな「伝説」(本稿での推測も含まれることはいままでのない)ができないように、今後も先入観にとらわれない研究を続けていく必要がある。結核予防法が廃止され感染症法に統合される際に、テロ対策の名目で MDRTB 菌株の移動が制限されることとなった。このことで MDRTB の研究が後退しないことを願いながら本稿を終了する。

文 献

- 1) Davis YM, McCray E, Simone PM : Hospital infection control practices for tuberculosis. Clinics In Chest Medicine **18** : 19-33, 1997
- 2) 鈴木克洋 : 病院感染対策の進歩- 結核菌. 日本臨床 **60** (11) : 2172-2176, 2002
- 3) 露口一成 : 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字 **293** : 8-12, 2003
- 4) 露口一成, 鈴木克洋, 坂谷光則ほか : 多剤耐性結核の再感染. 結核 **81** : 80-81, 2006
- 5) Tsuyuguchi K, Yoshida S, Suzuki K, et al. : Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis including transmission by exogenous re-infection. (in submission)
- 6) Nieman S, Richter E, Rush-Gerdes S, et al. : Double infection with a resistant and multidrug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis **6** : 548-551, 2000
- 7) Narvskaya O, Otten T, Limeshenco E, et al. : Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **21** : 596-603, 2002
- 8) CDC : Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Facilities, 1994. MMWR **43** (RR13) : 1-132, 1994
- 9) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 坂谷光則ほか : 結核菌の分子疫学的解析- 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較. 結核 (投稿中)
- 10) 松本智成 : 結核菌分子疫学解析法を用いた大阪における外来性再感染の考察. 結核 **81** : 87-91, 2006

インフルエンザ
Q&A

株式会社 日 日



© 医薬ジャーナル社

インフルエンザ Q&A

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野教授 **永武 毅 編**

A 5 判 108 頁 定価 3,990 円 (本体 3,800 円 + 税 5 %) 送料実費
ISBN 4-7532-1860-0 C3047

◎インフルエンザの権威者による、最新情報のエッセンス!

◎インフルエンザ流行のシーズンを迎え、一般臨床医、看護婦、薬剤師必読の書!

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⁾/冨田元久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⁹⁾。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⁹⁾。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”抗酸菌検査用ウェルバック培地S(日本ビーシージー)とバクテックMGIT960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

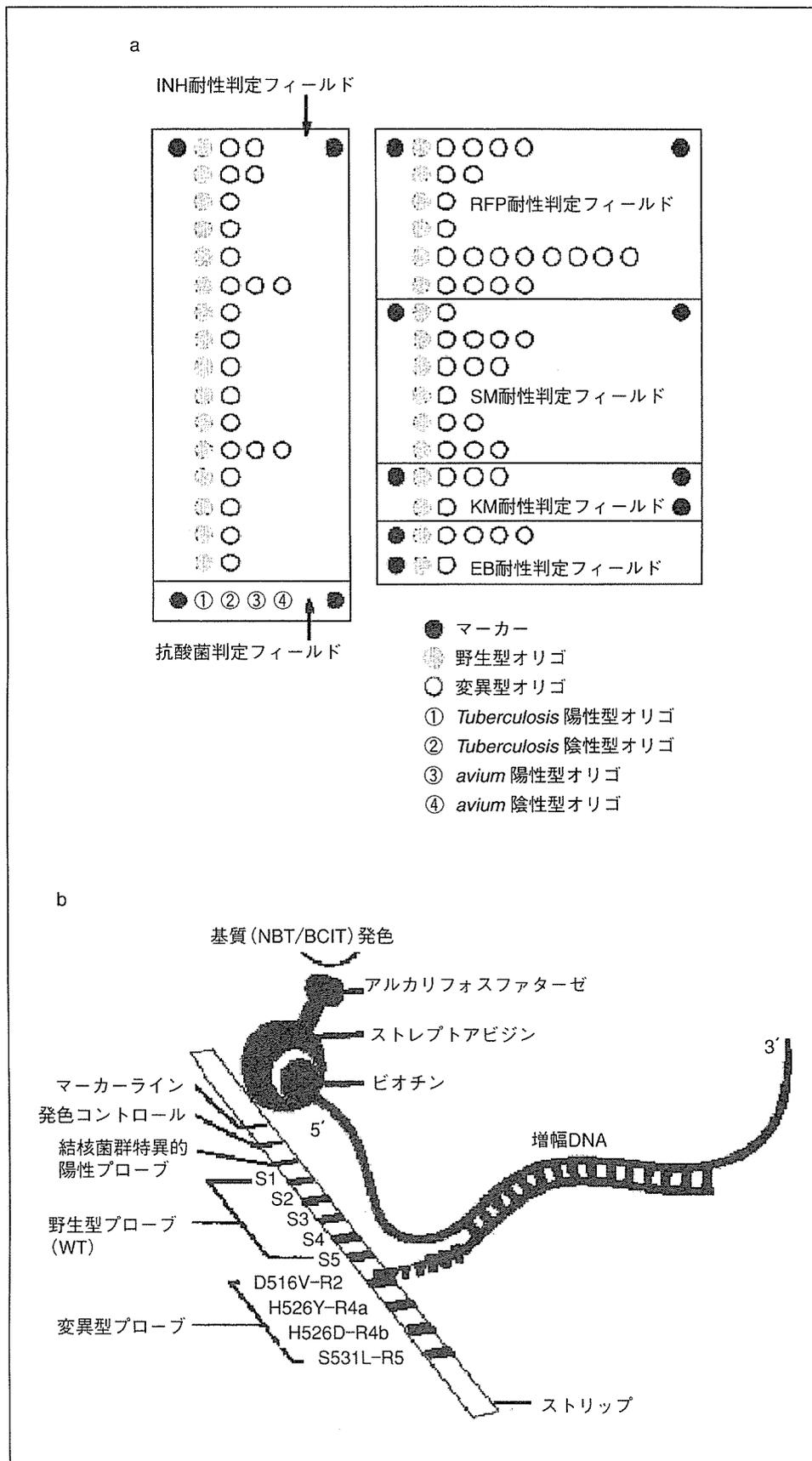


図1 結核菌の薬剤耐性遺伝子検査キット
 a: OligoArray-TB(日清紡資料), b: フィノス LiPA Rif TB(ニプロ資料)

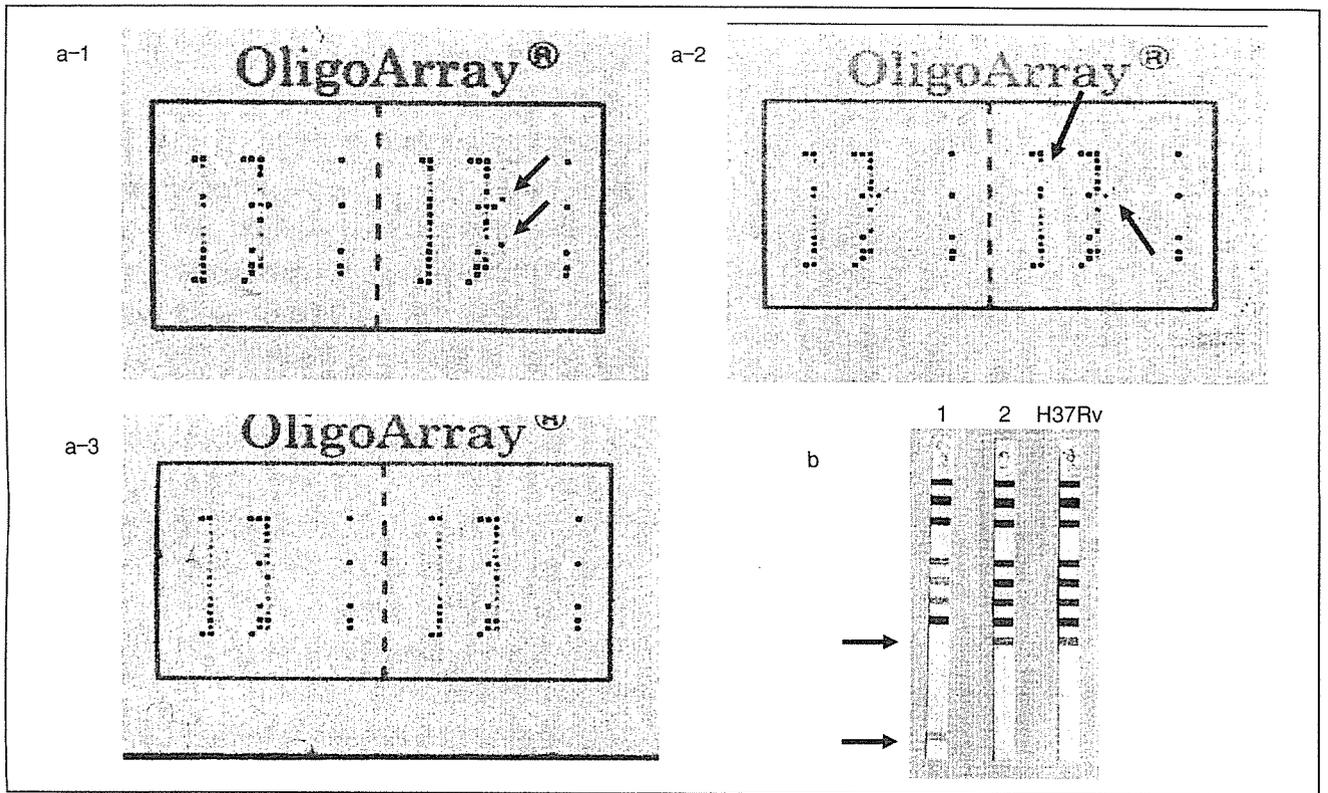


図2 培養陰性喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果

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.

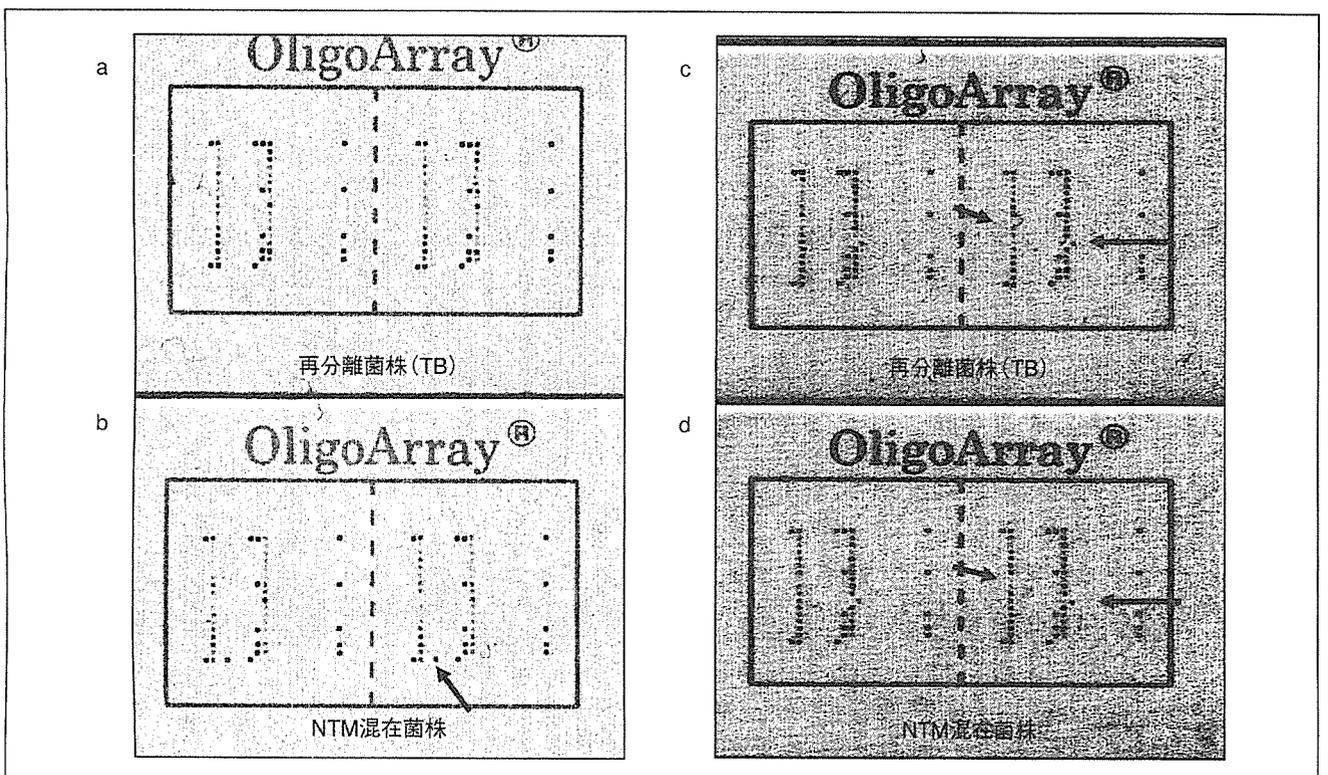


図3 NTM 混在喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果

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.

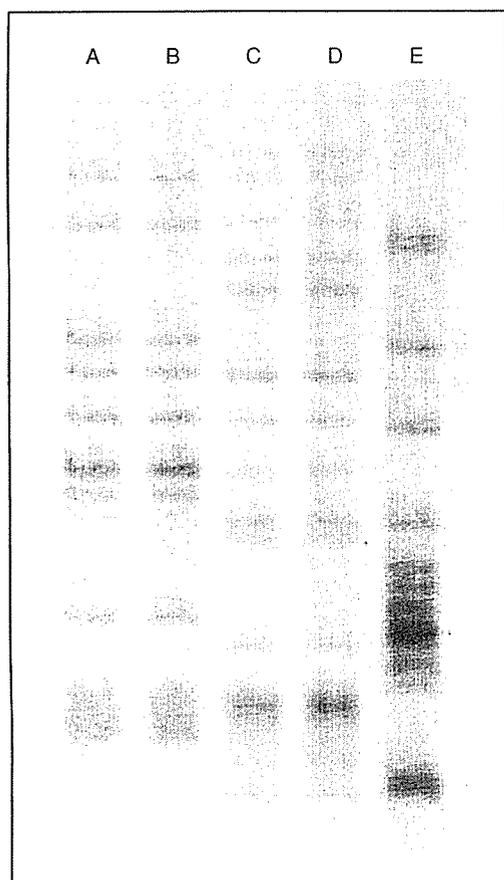


図4 IS6110-RFLP 解析結果
 A：結核菌分離培養後菌株 A からの DNA，
 B：NTM(*M. avium*)混在時菌株 A からの DNA，
 C：結核菌分離培養後菌株 B からの DNA，
 D：NTM(*M. intracellulare*)混在時菌株 B からの DNA，
 E：結核菌標準菌株 H 37 Rv.

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	S 1 欠損
7	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R	S 5 欠損 R 5
8	R (RFP)	R (RFP)	R (RFP)	R	S 5 欠損 R 5
9	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R	S 4 欠損 R 4 b
10	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S 5 欠損 R 5
11	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S 5 欠損 R 5

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剤耐性遺伝子はRFPでは*rpoB*、INHでは*inhA*、*katG*、SMでは*rrs*、*rpsL*、エタンブトール(EB)では*embB*、カナマイシン(KM)では*rrs*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(ウエルパック、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. *防菌防微* 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)

リファンピシン耐性 *Mycobacterium kansasii* における *rpoB* 変異の解明

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ⁴岩本 朋忠
²富田 元久 ¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨：〔目的〕 *M. kansasii* における RFP 耐性機序の解明。〔方法〕 2001年1月1日から2005年11月30日の期間中，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離同定された *M. kansasii* 314株を対象に薬剤感受性試験を実施し，RFP 耐性と判定された *M. kansasii* について *rpoB* 遺伝子解析を行った。〔結果〕 薬剤感受性試験の結果 RFP 耐性と判定された *M. kansasii* は314株中3株 (0.96%) であり，最小発育阻止濃度 (MIC 値) はすべて $1 \mu\text{g/ml}$ 以上を示した。*rpoB* 遺伝子変異のシーケンス解析において，RFP 耐性菌株すべてに *rpoB* 遺伝子領域の変異を認めた (コドン 513, 516)。〔考察〕 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は結核菌と同じ hot spot 領域 (69 bp) にあり，結核菌同様 RFP 耐性と強い関連性が示された。

キーワード： *Mycobacterium kansasii*, RFP 耐性, *rpoB* 遺伝子, 薬剤感受性試験

はじめに

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) は非結核性抗酸菌 (NTM) の中では，*Mycobacterium avium* complex (MAC) に次いで全国的に広く症例報告されている菌種であり¹⁾，病原性も他の NTM に比べて強いとされている一方，NTM の中で最も化学療法の有効性が認められている。結核菌に準じた薬剤感受性試験は通常 NTM に対して臨床的に有効な成績が得られないが，唯一 *M. kansasii* のリファンピシン (RFP) 感受性検査結果は臨床上有益である^{2)~4)}。しかし *M. kansasii* の RFP 耐性化における遺伝子変異のメカニズムの報告は少ない⁵⁾。そこで今回われわれは *M. kansasii* の遺伝子レベルでの RFP 耐性機序を解明するため，現行の薬剤感受性試験で RFP 耐性と判定された菌株の *rpoB* 遺伝子変異解析を行った。

方 法

対 象

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて2001年1月1日から2005年11月30日の期間中に分

離同定された *M. kansasii* 314株。すべての菌株の鑑別・同定は，アキュプロープ マイコバクテリウム カンサシ 研究用 (極東製薬) で行った。

薬剤感受性試験

小川培地を用いるニチビー抗酸菌検査用ウエルバック 培地 S (日本ビーシージー) と液体培地を用いる抗酸菌 薬剤感受性検査プロスミック NTM (極東製薬) で実施した。

コントロール菌液の作成

感受性コントロールとして *M. kansasii* 標準菌株 ATCC 12478 を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に培養した菌液を用いた (KCHK1001S)。また耐性コントロールとして使用するため，われわれは誘導 RFP 耐性 *M. kansasii* (KCHK1001R) を作成した。まず KCHK1001S 同様，同標準菌株を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に接種し，McFarland No. 0.5 に調整した菌液を滅菌生理食塩水で5倍希釈した。次にバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズのリファンピシンを含む MGIT チューブ (最終薬剤濃度 $1.0 \mu\text{g/ml}$) を2倍希釈して128倍までの薬剤濃度系列を作成した (リファ

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター，²臨床検査科，³内科，⁴神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，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 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
 (Received 1 Feb. 2006 / Accepted 25 Apr. 2006)

ンピシリン保存溶液)。後はバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズの説明書に記載されたプロトコールに従い、菌液 500 μ l と希釈されたリファンピシリン保存溶液 100 μ l を通常の RIF と表示されたミジットチューブに無菌的に添加した。バクテック MGIT 960 にて 37°C で培養し、陽性を示した最高濃度の菌液を用いて再度希釈系列にて培養を継続した。最終的にプロスミック NTM の RFP 感受性検査で MIC 値が 32 μ g/ml 以上の値を示すまで継代培養を続け、耐性コントロールとした。

PCR による *rpoB* 遺伝子増幅

小川培地からエーゼで 2～3 mm 径コロニー 2 個分を目安として採取し、1.5 ml マイクロチューブに分注したインスタジーン DNA 精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ l に懸濁した。56°C, 15～30 分処理後 10 秒間 vortex し、正確に 100°C, 8 分間処理した後直ちに放冷した。10 秒間 vortex し、12000 rpm, 3 分遠心した上清を polymerase chain reaction (PCR) に用いた。*rpoB* 遺伝子増幅のために、次のプライマーを使用した; MK1: 5'-GCG GAT GAC CAC CCA GGA CG-3' と MK2: 5'-GCG CGG TCC TC[C/T] TCG TCG GC-3'。PCR 条件は 95°C 3 分の熱変性の後、94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル行った。最後に 72°C 7 分間伸張した。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した。

PCR 産物の DNA シークエンス

rpoB 遺伝子の塩基配列は、290 bp の PCR 産物を用いて BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI) にて決定した。

フィノス LiPA Rif TB

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⁶⁾。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。今回 *M. kansasii* に対しても結核菌同様、同キットによる *rpoB* 変異の検出が可能かどうか検討した。

結 果

薬剤感受性試験の RFP 耐性判定基準値は、結核菌に準拠したウエルパック法では 40 μ g/ml だが、プロスミック NTM 法では、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS: 現 Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI]) の判定基準から 1 μ g/ml とした^{7,8)}。ウエルパック法、プロスミック NTM 法ともに RFP 耐性と判定された *M. kansasii* は 314 株中 3 株であった。菌株 A はウエルパック法、プロスミック NTM 法共に耐性と判定され、MIC 値は 2 μ g/ml だった。菌株 B, C は、両薬剤感受性試験で耐性と判定され、MIC 値はそれぞれ 16 μ g/ml と 32 μ g/ml であった。菌株 KCHK1001S は RFP 感受性 (MIC 値 0.06 μ g/ml) であった (Table)。また今回ウエルパック法とプロスミック NTM 法の間で RFP 感受性結果の相違は認められなかった。

シークエンス解析の結果、菌株 KCHK1001S の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域 (69 bp) の塩基配列は結核菌の塩基配列と 87% の相同性が見られ (GenBank #L27989)、すでに報告されている *rpoB* 遺伝子の塩基配列と同一であった (GenBank #AF060301)。

薬剤感受性試験で RFP 感受性と判定された *M. kansasii* 45 株についてシークエンス解析を実施した結果、*rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。しかし RFP 耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子の塩基配列は薬剤感受性試験で RFP 耐性となった *M. kansasii* 3 株および、菌株 KCHK1001R すべてに変異を認めた。菌株 A はコドン 516 においてアスパラギン酸からアラニンへの変異を認めた (GAC → GCC)。菌株 B, C はコドン 513 においてグルタミンからグルタミン酸への変異を認めた (CAG → GAG)。菌株 KCHK1001R はコドン 526 においてヒスチジンからアルギニンへの変異を認めた (CAC → CGC) (Fig. 1)。

フィノス LiPA Rif TB の結果、RFP 感受性ならびに RFP 耐性 *M. kansasii*, KCHK1001S, KCHK1001R すべて

Table Results of RFP susceptibility testing and sequences

Strains	Wellpack*	BrothMIC NTM (MIC)	Sequence
A	RFP resistant	R (2 μ g/ml)	codon 516 (GAC → GCC)
B	RFP resistant	R (16 μ g/ml)	codon 513 (CAG → GAG)
C	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 513 (CAG → GAG)
KCHK1001R	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 526 (CAC → CGC)
KCHK1001S	RFP susceptible	S (0.06 μ g/ml)	

*Ogawa medium based drug susceptibility test

RFP: rifampicin R: rifampicin resistance S: rifampicin susceptible

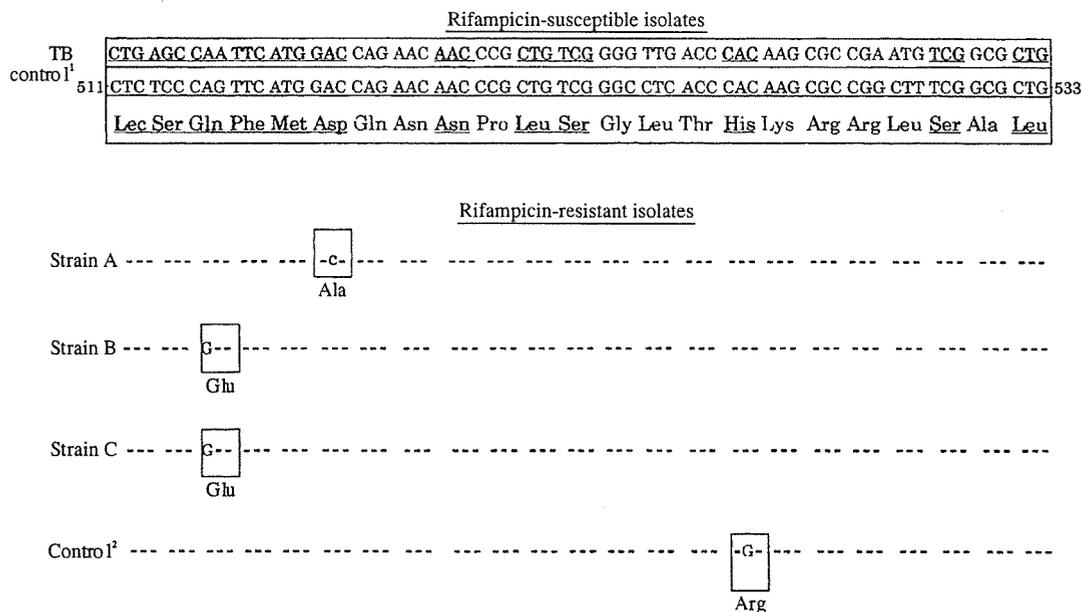


Fig. 1 *rpoB* gene sequences of one rifampicin-susceptible and four rifampicin-resistant strains of *Mycobacterium kansasii*, with the *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) sequence shown for comparison.
 1: KCHK1001S (rifampicin-susceptible control)
 2: KCHK1001R (rifampicin-resistant control)
 Underline codons in *M. tuberculosis*: common codons involved in rifampicin-resistance strains

においてTBプローブ、野生型 (S) ならびに変異型 (R) プローブに発色を示さなかった (Fig. 2)。

考 察

結核菌のRFP耐性化には *rpoB* 遺伝子の突然変異が強くかかわっており、RFP耐性結核菌の約95%が、βサブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域に変異を認めている⁹⁾。今回検討したRFP耐性 *M. kansasii* についても、結核菌と同じ hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異が確認され、RFP感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異が認められなかった。Kleinらは、RFP耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は、結核菌のRFP耐性に強く関与が証明されている *rpoB* 遺伝子変異と同じ領域に存在し、*M. kansasii* についても *rpoB* 変異とRFP耐性とに強い関連性があると報告している⁹⁾。今回の *rpoB* 変異のシーケンス解析で、菌株B、Cはコドン513の変異があり、Kleinらと同じ遺伝子変異をもったタイプであったが、菌株Aはコドン516の変異をもち、Kleinらとは違う変異部位であった。また、Kleinらは臨床菌株3例、環境分離菌株1例にコドン531の変異が見られたと報告しているが、今回われわれの検証では、コドン531の変異は認められなかった。コドン531は結核菌で頻繁に変異しやすい部位であることから¹⁰⁾、今後データの蓄積によりコドン531に変異をもった菌株や、異なる変異部位を

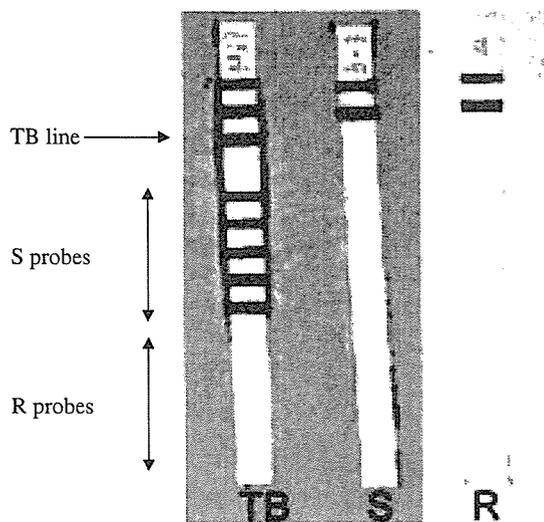


Fig. 2 The patterns of rifampicin-susceptible and resistant strains of *M. kansasii* by Line Probe Assay.
 TB: *M. tuberculosis* (H37Rv) indicated the reaction of the TB line and the five S probes
 S: KCHK1001S (rifampicin-susceptible strain of *M. kansasii*)
 R: KCHK1001R (rifampicin-resistant strain of *M. kansasii*)

もった違うタイプの *M. kansasii* の存在も認められるであろう。またわれわれが作成した菌株 KCHK1001R の変異はコドン 526 であった。Klein らが作成した誘導 RFP 耐性 *M. kansasii* は今回われわれが MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズのリファンピシン感受性検査用チューブを用いた方法とは違い、ミドルブルック 7H11 培地を用いた手法で作成されているが、同じコドン 526 の部位に変異をもっていた⁹⁾。以上のことから *in vitro* で RFP 耐性を獲得した *M. kansasii* は、コドン 526 の遺伝子部位に変異を起こしやすい可能性が考えられる。同様に、菌株 KCHK1001S ならびに RFP 感受性 *M. kansasii* 45 株はすべてシークエンス解析において hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めなかったことから、RFP 感受性試験結果と *rpoB* 遺伝子変異の強い関連性が示唆された。

また、結核菌群と同じ 69 bp の hot spot 領域に変異をもつ RFP 耐性 *M. kansasii* が結核菌群と同じ遺伝子変異をもつならば、結核菌群に特異的なプローブと反応する可能性がある。そこでわれわれは結核菌群の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域の変異を検出するキットであるフィノス LiPA Rif TB を用いて、RFP 耐性 *M. kansasii* の反応を検討した。しかし *M. kansasii* に対してプローブの検出が全く認められなかった (Fig. 2)。Fig. 1 で示したシークエンス解析結果から、*M. kansasii* は結核菌と同じアミノ酸配列を有する *rpoB* 領域をもつが、塩基配列では結核菌と違う構造をもつため、*M. kansasii* は同キットでは反応しなかったものと思われる。

M. kansasii の野生株は基本的に RFP 感受性であり、治療中に耐性を獲得するといわれている^{4) 11)}。今回の検証では全 *M. kansasii* に占める RFP 耐性菌の割合は 314 株中 3 株 (0.96%) であり、1989 年から 1992 年の間に実施された米国テキサス州での大規模な疫学調査 (464 株) で RFP 耐性 *M. kansasii* の占める割合が 17 株 (4%)⁴⁾ だった結果と比較しても耐性率はかなり低い。実施期間の違いや地域差を考慮する必要があるが、薬剤感受性試験をルーチンとしてすべての *M. kansasii* に実施することは非効率と考えられる結果となった。今後コスト面での対応も含めて考えていく必要がある。

今回 RFP 耐性 *M. kansasii* は、結核菌群と同じ hot spot

領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めたが、RFP 感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。これらのことから、RFP 耐性 *M. kansasii* と *rpoB* 遺伝子変異との間に強い関連性が証明された。

文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest*. 1983; 83: 890-892.
- 2) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: S1-S25.
- 3) Yates MD, Collins CH: Sensitivity of opportunist mycobacteria to rifampicin and ethambutol. *Tubercle*. 1981; 62: 117-121.
- 4) Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al.: Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 736-743.
- 5) Klein JL, Brown TJ, French GL: Rifampin resistance in *Mycobacterium kansasii* is associated with *rpoB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 3056-3058.
- 6) 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*. 2000; 75: 575-581.
- 7) Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards document. 2003; M24-A: 23.
- 8) Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, et al.: Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*. 1986; 24: 976-981.
- 9) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 10) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous *in vitro*-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 3298-3301.
- 11) Ahn CH, Wallace RJ Jr, Steele LC, et al.: Sulfonamide-containing regimens for disease caused by rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 135: 10-16.