

TLR ligands/IL-1 (12). However, whether Trib family members regulate TLR-mediated signaling pathways under physiological conditions is still unknown.

In this study, we generated Trib1-deficient mice by gene targeting and analyzed TLR-mediated responses. Although the activation of NF- κ B and MAP kinases in response to LPS was comparable between wild-type and Trib1-deficient cells, microarray analysis revealed that a subset of LPS-inducible genes was dysregulated in Trib1-deficient cells. Subsequent yeast two-hybrid analysis identified the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family member NF-IL6 (also known as C/EBP β) as a binding partner of Trib1, and phenotypes found in NF-IL6-deficient cells were opposite to those observed in Trib1-deficient cells. Moreover, overexpression of Trib1 inhibited NF-IL6-mediated gene expression and reduced amounts of NF-IL6 proteins. Inversely, NF-IL6 DNA-binding activity and LPS-inducible NF-IL6-target gene expression were up-regulated in Trib1-deficient cells, in which amounts of NF-IL6 proteins were increased. These results demonstrate that Trib1 plays an important role in NF-IL6-dependent gene expression in the TLR-mediated signaling pathways.

RESULTS

Comprehensive gene expression analysis in Trib1-deficient macrophages

To assess the physiological function of Trib1 in TLR-mediated immune responses, we performed a microarray analysis to compare gene expression profiles between wild-type and Trib1-deficient macrophages in response to LPS (Fig. 1 A and Fig. S1, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20070183/DC1>). Out of 45,102 transcripts, we first defined the genes induced more than twofold after LPS stimulation in wild-type cells as "LPS-inducible genes" and identified 790 of them (Table S1). We next compared the LPS-inducible genes in wild-type and Trib1-deficient macrophages after LPS stimulation and found 59, 703, and 28 genes as up-regulated, similarly expressed, and down-regulated in Trib1-deficient cells, respectively (Table S1).

Among the up-regulated genes, several were subsequently tested by Northern blotting to confirm the accuracy. LPS-induced expression of prostaglandin E synthase (mPGES), lipocalin-2 (24p3), arginase type II, and plasminogen activator inhibitor type II, which were highly up-regulated in the microarray analysis (Table S1), was indeed enhanced in Trib1-deficient macrophages (Fig. 1 B). Furthermore, in contrast to proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, which were similarly expressed between wild-type and Trib1-deficient cells in response not only to LPS but also to other TLR ligands, IL-12 p40 was down-regulated in Trib1-deficient cells compared with wild-type cells (Fig. 1 C; Fig. S2, A–C, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20070183/DC1>; and Table S1). Thus, the comprehensive microarray analysis revealed that a subset of LPS-inducible genes is dysregulated in Trib1-deficient cells.

Previous *in vitro* studies demonstrate that human Trib family members modulate activation of MAP kinases and

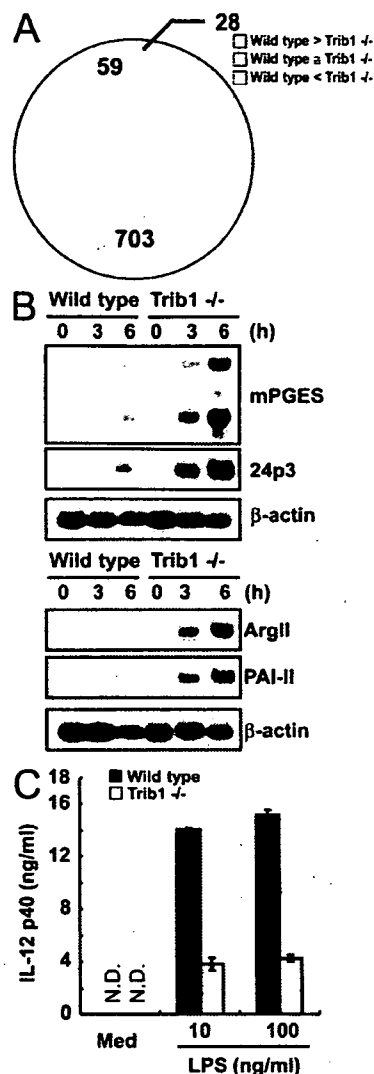


Figure 1. Dysregulation of a subset of LPS-inducible genes in Trib1-deficient cells. (A) Summary of DNA chip microarray analysis. 790 LPS-inducible genes were divided into up-regulated (yellow), similarly expressed (pink), and down-regulated (blue) groups, with the indicated amounts of each. (B) Peritoneal macrophages from wild-type or Trib1-deficient mice were stimulated with 10 ng/ml LPS for the indicated periods. Total RNA (10 μ g) was extracted and subjected to Northern blot analysis for the expression of the indicated probes. (C) Peritoneal macrophages from wild-type and Trib1-deficient mice were cultured with the indicated concentrations of LPS in the presence of 30 ng/ml IFN- γ for 24 h. Concentrations of IL-12 p40 in the culture supernatants were measured by ELISA. Indicated values are means \pm SD of triplicates. Data are representative of three (B) or two (C) independent experiments. N.D., not detected.

NF- κ B (7–12). Both wild-type and Trib1-deficient cells showed similar levels and time courses of phosphorylation of p38, Jnk and extracellular signal-regulated kinase, and I κ B α degradation (Fig. S2 D), indicating that the dysregulated

expression of LPS-inducible genes in Trib1-deficient cells might be independent of activation of NF- κ B and MAP kinases.

Interaction of Trib1 with NF-IL6

To explore signaling aspects of Trib1 deficiency other than NF- κ B and MAP kinases, we performed a yeast-two-hybrid screen with the full length of human Trib1 as bait to identify a binding partner of Trib1 and identified several clones as being positive. Sequence analysis subsequently revealed that three clones encoded the N-terminal portion of a member of the C/EBP NF-IL6 (unpublished data). We initially tested the interaction of Trib1 and NF-IL6 in yeasts. AH109 cells were transformed with a plasmid encoding the full length of Trib1 together with a plasmid encoding the N-terminal portion of NF-IL6 obtained by the screening (Fig. 2 A). We next examined the interaction in mammalian cells using immunoprecipitation experiments. HEK293 cells were transiently transfected with a plasmid encoding the full length of mouse Trib1 together with a plasmid encoding the full length of mouse NF-IL6. Myc-tagged NF-IL6 was coimmunoprecipitated

with Flag-Trib1 (Fig. 2 B), showing the interaction of Trib1 and NF-IL6 in mammalian cells.

TLR-mediated immune responses in NF-IL6-deficient macrophages

An in vitro study showing the interaction of Trib1 and NF-IL6 prompted us to examine the TLR-mediated immune responses in NF-IL6-deficient cells, because LPS-induced expression of mPGES is shown to depend on NF-IL6 (13). We initially analyzed the expression pattern of genes affected by the loss of Trib1 in NF-IL6-deficient macrophages by Northern blotting. LPS-induced expression of 24p3, plasminogen activator inhibitor type II, and arginase type II, as well as mPGES, was profoundly defective in NF-IL6-deficient cells (Fig. 2 C). We next tested IL-12 p40 production by ELISA. As previously reported, IL-12 p40 production by LPS stimulation was increased in a dose-dependent fashion in NF-IL6-deficient cells compared with control cells (Fig. 2 D) (14). In addition, the production in response to bacterial lipoprotein (BLP), macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2), or CpG DNA was also augmented in

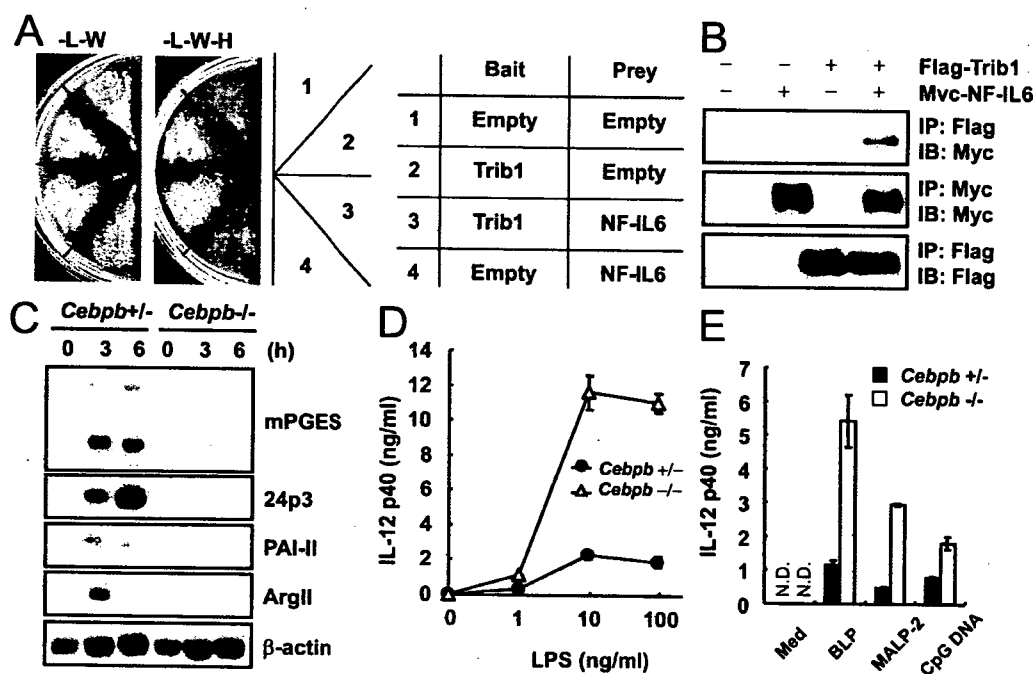


Figure 2. Association of Trib1 with NF-IL6 and TLR-mediated responses in NF-IL6-deficient macrophages. (A) Plasmids expressing human Trib1 fused to the GAL4 DNA-binding domain or an empty vector were cotransfected with a plasmid expressing NF-IL6 fused to GAL4 transactivation domain or an empty vector. Interactions were detected by the ability of cells to grow on medium lacking tryptophan, leucine, and histidine (-L-W-H). The growth of cells on a plate lacking tryptophan and leucine (-L-W) is indicative of the efficiency of the transfection. (B) Lysates of HEK293 cells transiently cotransfected with 2 μ g of Flag-tagged Trib1 and/or 2 μ g Myc-tagged NF-IL6 expression vectors were immunoprecipitated with the indicated antibodies. (C) Peritoneal macrophages from wild-type or NF-IL6-deficient mice were stimulated with 10 ng/ml LPS for the indicated periods. Total RNA (10 μ g) was extracted and subjected to Northern blot analysis for expression of the indicated probes. (D and E) Peritoneal macrophages from wild-type and NF-IL6-deficient mice were cultured with the indicated concentrations of LPS (D) or with 100 ng/ml BLP, 30 ng/ml MALP-2, or 1 μ M CpG DNA (E) in the presence of 30 ng/ml IFN- γ for 24 h. Concentrations of IL-12 p40 in the culture supernatants were measured by ELISA. Indicated values are means \pm SD of triplicates. Data are representative of three (B) and two (C-E) separate experiments. N.D., not detected.

NF-IL6-deficient cells (Fig. 2 E). Together, compared with Trib1-deficient cells, converse phenotypes in terms of TLR-mediated immune responses are observed in NF-IL6-deficient cells.

Inhibition of NF-IL6 by Trib1 overexpression

To test whether Trib1 down-regulates NF-IL6-dependent activation, HEK293 cells were transfected with an NF-IL6-dependent luciferase reporter plasmid together with NF-IL6 and various amounts of Trib1 expression vectors (Fig. 3 A). NF-IL6-mediated luciferase activity was diminished by co-expression of Trib1 in a dose-dependent manner. Moreover, RAW264.7 macrophage cells overexpressing Trib1 exhibited reduced expression of mPGES and 24p3 in response to LPS (Fig. S3 A, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20070183/DC1>). We next tested NF-IL6 DNA-binding activity by EMSA and observed less NF-IL6 DNA-binding activity in HEK293 cells coexpressing NF-IL6 and Trib1 than in ones transfected with the NF-IL6 vector alone (Fig. 3 B), presumably accounting for the down-regulation of the NF-IL6-dependent gene expression by Trib1. We then examined the effect of Trib1 on the amounts of NF-IL6 proteins by Western blotting. Although the diminution of NF-IL6 by Trib1 was marginal when excess amounts of NF-IL6 were expressed, we found that the transient expression of lower levels of NF-IL6, together with Trib1, resulted in a reduction of NF-IL6 in HEK293 cells (Fig. 3 C). Also, endogenous levels of NF-IL6 proteins in RAW264.7 cells overexpressing Trib1 were markedly less than those in control cells (Fig. 3 D). These results demonstrated that overproduction of Trib1 might negatively regulate NF-IL6 activity *in vitro*.

Up-regulation of NF-IL6 in Trib1-deficient cells

We next attempted to check the *in vivo* status of NF-IL6 in Trib1-deficient cells by comparing the NF-IL6 DNA-binding activity in Trib1-deficient macrophages with that in wild-type cells by EMSA. Although LPS-induced NF- κ B-DNA complex formation in Trib1-deficient cells was similarly observed, Trib1-deficient cells exhibited elevated levels of C/EBP-DNA complex formation compared with wild-type cells (Fig. 4 A). We further examined whether the C/EBP-DNA complex in Trib1-deficient cells contained NF-IL6 by supershift assay. Addition of anti-NF-IL6 antibody into the C/EBP-DNA complex yielded more super-shifted bands in Trib1-deficient cells than in wild-type cells (Fig. 4 B). In addition, the C/EBP-DNA complex was not shifted by the addition of anti-C/EBP δ (also known as NF-IL6 β) antibody (Fig. S4 A, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20070183/DC1>), suggesting that NF-IL6 DNA-binding activity is augmented in Trib1-deficient cells. We then examined the amounts of NF-IL6 proteins by Western blotting (Fig. 4 C). Compared with wild-type cells, Trib1-deficient cells showed increased levels of NF-IL6 proteins. Finally, we examined NF-IL6 mRNA levels by Northern blotting and observed enhanced expression of NF-IL6 mRNA in Trib1-deficient cells (Fig. 4 D), which is consistent with the autocrine induction of NF-IL6 mRNA

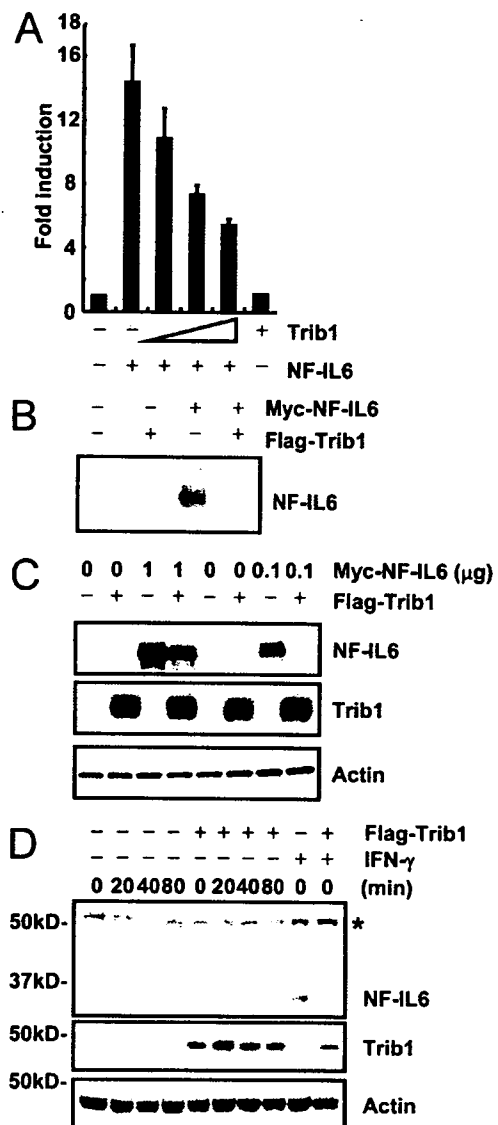


Figure 3. Inhibition of NF-IL6 activity by Trib1 overexpression. (A) HEK293 cells were transfected with an NF-IL6-dependent luciferase reporter together with either Trib1 and/or NF-IL6 expression plasmids. Luciferase activities were expressed as the fold increase over the background shown by lysates prepared from mock-transfected cells. Indicated values are means \pm SD of triplicates. (B) HEK293 cells were transfected with 0.1 μ g NF-IL6 expression vector together with 4 μ g Trib1 expression plasmids. Nuclear extracts were prepared, and C/EBP DNA-binding activity was determined by EMSA using a probe containing the NF-IL6 binding sequence from the mouse 24p3 gene. (C) Lysates of HEK293 cells transiently cotransfected with 2 μ g of Flag-tagged Trib1 alone or the indicated amounts of Myc-tagged NF-IL6 expression vectors were immunoblotted with anti-Myc or -Flag for detection of NF-IL6 or Trib1, respectively. (E) RAW 264.7 cells stably transfected with either an empty vector or Flag-Trib1 were stimulated with 10 ng/ml LPS for the indicated periods. The cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. A protein that cross-reacts with the antibody is indicated (*). Data are representative of three (A and C) and two (B and D), separate experiments.

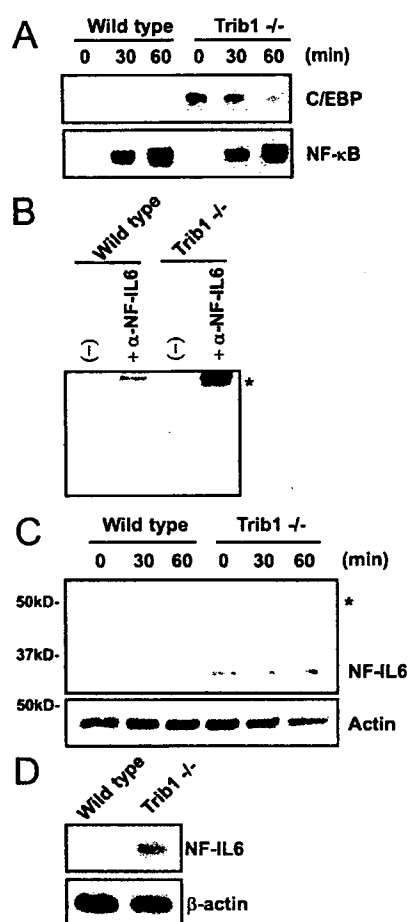


Figure 4. Up-regulation of NF-IL6 activity in Trib1-deficient cells. (A) Peritoneal macrophages from wild-type or Trib1-deficient mice were stimulated with 10 ng/ml LPS for the indicated periods. Nuclear extracts were prepared, and C/EBP DNA-binding activity was determined by EMSA using a C/EBP consensus probe. (B) Nuclear extracts of wild-type and Trib1-deficient unstimulated macrophages were preincubated with anti-NF-IL6, followed by EMSA to determine the C/EBP DNA-binding activity. Supershifted bands are indicated (*). (C) Peritoneal macrophages from wild-type or Trib1-deficient mice were stimulated with 10 ng/ml LPS for the indicated periods and lysed. The cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. A protein that cross-reacts with the antibody is indicated (*). (D) Total RNA (10 μ g) from unstimulated peritoneal macrophages from wild-type or NF-IL6-deficient mice was extracted and subjected to Northern blot analysis for expression of the indicated probes. Data are representative of two (A and B) and three (C and D) separate experiments.

in a previous study (15). Thus, Trib1 may negatively control amounts of NF-IL6 proteins, thereby affecting TLR-mediated NF-IL6-dependent gene induction.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate by microarray analysis and biochemical studies that Trib1 is associated with NF-IL6 and negates NF-IL6-dependent gene expression by reducing the amounts of NF-IL6 proteins in the context of TLR-mediated responses.

Especially regarding IL-12 p40, although the microarray data showed an almost twofold reduction of the mRNA in Trib1-deficient cells (Table S1), the production was three to four times lower than that in wild-type cells (Fig. 1 C), suggesting translational control of IL-12 p40 by Trib1 in addition to the transcriptional regulation. Moreover, the transcription of the IL-12 p40 gene itself may be affected by not only the amount of NF-IL6 proteins but also the phosphorylation or the isoforms such as liver-enriched activator protein and liver-enriched inhibitory protein (16–18). The molecular mechanisms of how Trib1 deficiency affects IL-12 p40 production on the transcriptional or translational levels through NF-IL6 regulation need to be carefully studied in the future.

The name Trib is originally derived from the *Drosophila* mutant strain *tribbles*, in which the *Drosophila* tribbles protein negatively regulates the level of *Drosophila* C/EBP *slbo* protein and C/EBP-dependent developmental responses such as border cell migration in larvae (19–22). It is also of interest that Trib1-deficient female mice and *Drosophila* in adulthood are both infertile (unpublished data) (18). In mammals, other Trib family members such as Trib2 and Trib3 have recently been shown to be involved in C/EBP-dependent responses (23, 24). Mice transferred with bone marrow cells, in which Trib2 is retrovirally overexpressed, display acute myelogenous leukemia-like disease with reduced activities and amounts of C/EBP α (23). In addition, ectopic expression of Trib3 inhibits C/EBP-homologous protein-induced ER stress-mediated apoptosis (24). Thus, the function of tribbles to inhibit C/EBP activities by controlling the amounts appears to be conserved throughout evolution.

Given the up-regulation of the mRNA in Trib1-deficient cells (Fig. 4 D), the reduction of NF-IL6 in Trib1-overexpressing cells (Fig. 3 C), the auto-regulation of NF-IL6 by itself (15), and the degradation of C/EBP α by Trib2 (23) and *slbo* by tribbles (22), the loss of Trib1 might primarily result in impaired degradation of NF-IL6 and, subsequently, in excessive accumulation of NF-IL6 via the autoregulation in Trib1-deficient cells.

In this study, we focused on the involvement of Trib1 in TLR-mediated NF-IL6-dependent gene expression. However, given that the levels of NF-IL6 proteins were increased in Trib1-deficient cells, it is reasonable to propose that other non-TLR-related NF-IL6-dependent responses might be enhanced in Trib1-deficient mice. Moreover, Trib3 is also shown to be involved in insulin-mediated Akt/PKB activation in the liver by mechanisms apparently unrelated to C/EBP, suggesting that Trib family members possibly function in a C/EBP-independent fashion (25–27). Future studies using mice lacking other Trib family members, as well as Trib1, may help to unravel the nature of mammalian tribbles in wider points of view.

MATERIALS AND METHODS

Generation of Trib1-deficient mice. A genomic DNA containing the *Trib1* gene was isolated from the 129/SV mouse genomic library and characterized by restriction enzyme mapping and sequencing analysis. The gene encoding mouse Trib1 consists of three exons. The targeting vector was constructed by replacing a 0.4-kb fragment encoding the second exon of the

Trib1 gene with a neomycin resistance gene cassette (*neo*) (Fig. S1 A). The targeting vector was transfected into embryonic stem cells (E14.1). G418 and gancyclovir doubly resistant colonies were selected and screened by PCR and Southern blot analysis (Fig. S1 B). Homologous recombinants were micro-injected into C57BL/6 female mice, and heterozygous F1 progenies were intercrossed to obtain *Trib1*^{-/-} mice. We interbred the heterozygous mice to produce offspring carrying a null mutation of the gene encoding Trib1. Trib1-deficient mice were born at the expected Mendelian ratio and showed a slight growth retardation with reduced body weight until 2–3 wk after birth (unpublished data). Trib1-deficient mice survived for >6 wk were analyzed in this study. To confirm the disruption of the gene encoding Trib1, we analyzed total RNA from wild-type and Trib1-deficient peritoneal macrophages by Northern blotting and found no transcripts for Trib1 in Trib1-deficient cells (Fig. S1 C). All animal experiments were conducted with the approval of the Animal Research Committee of the Research Institute for Microbial Diseases at Osaka University.

Reagents, cells, and mice. LPS (a TLR4 ligand) from *Salmonella minnesota* Re 595 and anti-Flag were purchased from Sigma-Aldrich. BLP (TLR1/TLR2), MALP-2 (TLR2/TLR6), and CpG oligodeoxynucleotides (TLR9) were prepared as previously described (28). Antiphosphorylated extracellular signal-regulated kinase, Jnk, and p38 antibodies were purchased from Cell Signaling. Anti-NF-IL6 (C/EBP β), C/EBP δ , actin, I κ B α , and Myc-probe were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. NF-IL6-deficient mice were as previously described (29). Epitope-tagged Trib1 fragments were generated by PCR using cDNA from LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages as the template and cloned into pCDNA3 expression vectors, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Measurement of proinflammatory cytokine concentrations. Peritoneal macrophages were collected from peritoneal cavities 96 h after thioglycollate injection and cultured in 96-well plates (10⁵ cells per well) with the indicated concentrations of the indicated ligands for 24 h, as shown in the figures. Concentrations of TNF- α , IL-6, and IL-12 p40 in the culture supernatant were measured by ELISA, according to manufacturer's instructions (TNF- α and IL-12 p40, Genzyme; IL-6, R&D Systems).

Luciferase reporter assay. The NF-IL6-dependent reporter plasmids were constructed by inserting the promoter regions (-1200 to +53) of the mouse 24p3 gene amplified by PCR into the pGL3 reporter plasmid. The reporter plasmids were transiently cotransfected into HEK293 with the control *Renilla* luciferase expression vectors using a reagent (Lipofectamine 2000; Invitrogen). Luciferase activities of total cell lysates were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), as previously described (28).

Yeast two-hybrid analysis. Yeast two-hybrid screening was performed as described for the Matchmaker two-hybrid system 3 (CLONTECH Laboratories, Inc.). For construction of the bait plasmid, the full length of human Trib1 was cloned in frame into the GAL4 DNA-binding domain of pGBKT7. Yeast strain AH109 was transformed with the bait plasmid plus the human lung Matchmaker cDNA library. After screening of 10⁶ clones, positive clones were picked, and the pACT2 library plasmids were recovered from individual clones and expanded in *Escherichia coli*. The insert cDNA was sequenced and characterized with the BLAST program (National Center for Biotechnology Information).

Microarray analysis. Peritoneal macrophages from wild-type or Trib1-deficient mice were left untreated or were treated for 4 h with 10 ng/ml LPS in the presence of 30 ng/ml IFN- γ . The cDNA was synthesized and hybridized to Murine Genome 430 2.0 microarray chips (Affymetrix), according to the manufacturer's instructions. Hybridized chips were stained and washed and were scanned with a scanner (GeneArray; Affymetrix). Microarray Suite software (version 5.0; Affymetrix) was used for data analysis. Microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus under accession no. GSE8788.

Western blot analysis and immunoprecipitation. Peritoneal macrophages were stimulated with the indicated ligands for the indicated periods, as shown in the figures. The cells were lysed in a lysis buffer (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl [pH 7.5], 5 mM EDTA) and a protease inhibitor cocktail (Roche). The cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. For immunoprecipitation, cell lysates were precleared with protein G-sepharose (GE Healthcare) for 2 h and incubated with protein G-sepharose containing 1 μ g of the antibodies indicated in the figures for 12 h, with rotation at 4°C. The immunoprecipitates were washed four times with lysis buffer, eluted by boiling with Laemmli sample buffer, and subjected to Western blot analysis using the indicated antibodies, as previously described (28).

EMSA and supershift assay. 2 \times 10⁶ peritoneal macrophages were stimulated with the indicated stimulants for the indicated periods, as shown in the figures. 2 \times 10⁶ HEK293 cells were transfected with 0.1 μ g Myc-NF-IL6 and/or 4 μ g Flag-Trib1 expression vectors. Nuclear extracts were purified from cells and incubated with a probe containing a consensus C/EBP DNA-binding sequence (5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'; Fig. 4, A and B) or mouse 24p3 NF-IL6 binding sequence (sense, 5'-CTTCTGTTGCTCAACCTTGCA-3'; antisense, 5'-TGCAAGTTGAGCAACAGGAAG-3'; Fig. 3 B), electrophoresed, and visualized by autoradiography, as previously described (28, 30). When the supershift assay was performed, nuclear extracts were mixed with the supershift-grade antibodies indicated in the figures before the incubation with the probes for 1 h on ice.

Online supplemental material. Fig. S1 showed our strategy for the targeted disruption of the mouse *Trib1* gene. Fig. S2 showed the status of proinflammatory cytokine production in response to various TLR ligands and LPS-induced activation of MAP kinases and I κ B degradation. Fig. S3 showed decreased expression of NF-IL6-dependent gene in Trib1-overexpressing cells. Fig. S4 showed that the C/EBP-DNA complex in Trib1-deficient cells contained NF-IL6, but not C/EBP δ . Table S1 provides a complete list of the LPS-inducible genes studied. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20070183/DC1>.

We thank M. Hashimoto for excellent secretarial assistance, and N. Okita, N. Iwami, N. Fukuda, and M. Morita for technical assistance.

This study was supported by the Special Coordination Funds, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, research fellowships from the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists, the Uehara Memorial Foundation, the Naito Foundation, the Institute of Physical and Chemical Research Junior Research Associate program, and the National Institutes of Health (grant AI070167).

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 24 January 2007

Accepted: 26 July 2007

REFERENCES

- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801.
- Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257–263.
- Kopp, E., and R. Medzhitov. 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15:396–401.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18:2195–2224.
- Zhang, Y.L., and C. Dong. 2005. MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* 2:20–27.
- Miggin, S.M., and L.A. O'Neill. 2006. New insights into the regulation of TLR signaling. *J. Leukoc. Biol.* 80:220–226.
- Hegedus, Z., A. Czibula, and E. Kiss-Toth. 2007. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell. Signal.* 19:238–250.
- Kiss-Toth, E., S.M. Bagstaff, H.Y. Sung, V. Jozsa, C. Dempsey, J.C. Caunt, K.M. Oxley, D.H. Wylie, T. Polgar, M. Harte et al. 2004.

- Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 279:42703–42708.
9. Wilkin, F., N. Suarez-Huerta, B. Robaye, J. Peetermans, F. Libert, J.E. Dumont, and C. Maenhaut. 1997. Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur. J. Biochem.* 248:660–668.
 10. Mayumi-Matsuda, K., S. Kojima, H. Suzuki, and T. Sakata. 1999. Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:260–264.
 11. Wu, M., L.G. Xu, Z. Zhai, and H.B. Shu. 2003. SINK is a p65-interacting negative regulator of NF- κ B-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 278:27072–27079.
 12. Kiss-Toth, E., D.H. Wylie, K. Holland, L. Marsden, V. Jozsa, K.M. Oxley, T. Polgar, E.E. Qvarnstrom, and S.K. Dover. 2006. Functional mapping and identification of novel regulators for the Toll/Interleukin-1 signalling network by transcription expression cloning. *Cell. Signal.* 18:202–214.
 13. Uematsu, S., M. Matsumoto, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J. Immunol.* 168:5811–5816.
 14. Gorgoni, B., D. Maritano, P. Marthyn, M. Righi, and V. Poli. 2002. C/EBP β gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *J. Immunol.* 168:4055–4062.
 15. Ranji, D.P., and P. Foka. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365:561–575.
 16. Plevy, S.E., J.H. Gemberling, S. Hsu, A.J. Dorner, and S.T. Smale. 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17:4572–4588.
 17. Zhu, C., K. Gagnidze, J.H. Gemberling, and S.E. Plevy. 2001. Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-12 p40 promoter. Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. *J. Biol. Chem.* 276:18519–18528.
 18. Bradley, M.N., L. Zhou, and S.T. Smale. 2003. C/EBP β regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 23:4841–4858.
 19. Scher, T.C., and M. Leptin. 2000. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.* 10:623–629.
 20. Mata, J., S. Curado, A. Ephrussi, and P. Rorth. 2000. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell.* 101:511–522.
 21. Grosshans, J., and E. Wieschaus. 2000. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell.* 101:523–531.
 22. Rorth, P., K. Szabo, and G. Texido. 2000. The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol. Cell.* 6:23–30.
 23. Keeshan, K., Y. He, B.J. Wouters, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, C.G. Rodriguez, I. Maillard, J.W. Tobias, P. Valk, et al. 2006. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 10:401–411.
 24. Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki, and H. Hayashi. 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24:1243–1255.
 25. Du, K., S. Herzig, R.N. Kulkarni, and M. Montminy. 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science.* 300:1574–1577.
 26. Koo, S.H., H. Satoh, S. Herzig, C.H. Lee, S. Hedrick, R. Kulkarni, R.M. Evans, J. Olefsky, and M. Montminy. 2004. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB3. *Nat. Med.* 10:530–534.
 27. Qi, L., J.E. Heredia, J.Y. Altarejos, R. Screaton, N. Goebel, S. Niessen, I.X. Macleod, C.W. Liew, R.N. Kulkarni, J. Bain, et al. 2006. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science.* 312:1763–1766.
 28. Yamamoto, M., T. Okamoto, K. Takeda, S. Sato, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Saitoh, N. Yamamoto, H. Sakurai, K.J. Ishii, et al. 2006. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7:962–970.
 29. Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, N. Shirafuji, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, and T. Kishimoto. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell.* 80:353–361.
 30. Shen, F., Z. Hu, J. Goswami, and S.L. Gaffen. 2006. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J. Biol. Chem.* 281:24138–24148.

第82回総会シンポジウム

Ⅱ. 抗酸菌検査法

座長 ¹高嶋 哲也 ²樋口 武史

キーワード：迅速検査，精度保証，採痰指導，同定検査，遺伝子検査，感受性検査

シンポジスト：

1. わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証
御手洗聡（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科）
2. 今回の結核菌検査指針改訂のポイント
阿部千代治（日本ベクトン・ディッキンソン（株））
3. 良質な検体とは一喀痰採取の方法等について一
樋口武史（京都大学医学部附属病院検査部）
4. 抗酸菌の培養・同定に関する最新情報
斎藤 肇（広島県環境保健協会）
5. 遺伝子検査の現状と将来展望
長沢光章（東北大学病院診療技術部）
6. 薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには
小栗豊子（順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科）

2000年に本学会抗酸菌検査法検討委員会は、結核菌検査診断技術の目覚ましい進歩と普及に鑑みて、「新結核菌検査指針2000」を刊行した。その後も相次いで、感度・特異度ならびに迅速性の向上を目指した検査法が開発・導入されている。そこで本委員会は、7年ぶりに結核菌検査指針の改訂を行い、現状に即した内容に整理することになった。「結核菌検査指針2007」は、塗抹検査を24時間以内に、結核菌の分離・同定を21日以内に、そして薬剤感受性結果を30日以内に報告することを求めたCDC勧告に沿った迅速検査体制の構築と抗酸菌検査の精度管理の普及に主眼をおいて執筆された。本シンポジウムは、この「結核菌検査指針2007」の改訂の主旨を広く知っていただくことを目的に企画した。

迅速検査体制の柱となる液体培養法や、液体培地を用

いた薬剤感受性検査あるいは遺伝子検査などがどの程度まで普及しているのか。また、近年の高度な手技が要求される抗酸菌検査の精度管理がどの程度まで行われているのか。その現状を知ることは今後の抗酸菌検査の方向性を議論するうえできわめて重要である。これらの点について結核予防会結核研究所の御手洗聡先生から「わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証」と題してご講演いただいた。阿部千代治先生から「今回の結核菌検査指針改訂のポイント」と題して抗酸菌検査の意義、安全管理、検査材料、検査の回数などの臨床現場での留意点や、CDC勧告に合致する迅速検査体制など、今回の改訂ポイントを総論的にご講演いただいた。検査感度の向上のために、本指針では検体の品質管理にも力点を置いた。結核の約8割を占める肺結核の喀痰検査の感度向上は治療・診断のみならず感染対策上も重要であり、そのためには検体検査として適切な喀痰を採取することが重要である。この点に関して臨床検査に従事し、現場の課題を熟知している京都大学医学部附属病院の樋口武史先生から「良質な検体とは一喀痰採取の方法等について一」と題して、採痰指導の有用性を中心にご講演をいただいた。抗酸菌検査の迅速性と感度の向上の観点から、培養は液体培養法が推奨され、同定は遺伝子検査法から、より迅速・簡便な免疫クロマトグラフィー法へと移行している。広島県環境保健協会の斎藤肇先生から「抗酸菌の培養・同定に関する最新情報」と題して、培養と菌種同定に関する最新的话题をご提供いただいた。核酸増幅法に代表される遺伝子検査法は今や結核診療において不可欠であり、培養感度に匹敵する新しい遺伝子検査法も登場している。東北大学病院の長沢光章先生から「遺伝子検査の現状と将来展望」と題して、最新の

¹大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、²京都大学医学部附属病院検査部

連絡先：樋口武史，京都大学医学部附属病院検査部，〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)
(Received 12 Nov. 2007)

遺伝子検査法とその留意点についてご講演いただいた。今回の迅速検査体制構築の要である薬剤感受性検査法について、本指針では迅速性に優れた液体培地法を推奨した。順天堂大学医学部附属練馬病院の小栗豊子先生から「薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには」と題して、液体培地を用いた迅速薬剤感受性検査の有用性とその課題についてご講演いただいた。結核菌検査は早期診断・早期治療や薬剤感受性検査結果に基づいた適正医

療の普及などの診療上だけでなく、院内感染対策や結核対策のツールとしても必須であり、その精度向上は重要である。そして、現状の入院期間短縮への方向性を鑑みると、わが国においてもCDC勧告に沿った迅速検査体制の構築は急務であり、今回の「結核菌検査指針2007」は時宜を得た改訂といえる。結核菌検査の精度管理の向上と迅速性に向けての本シンポジウムでの議論はわが国の結核医療のさらなる前進に寄与するものと期待する。

1. わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証

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 御手洗 聡

結核を含む抗酸菌感染症の診断において、細菌学的検査が重要であることはよく認識されているが、その精度に関する臨床的関心は決して高いとは言えない。臨床的な関心の低さと実践上の困難性から、抗酸菌検査の精度保証活動は、内部精度管理を含めてあまり実施されていないのが現状と思われる。今回、結核菌検査指針が改訂されるにあたって、あらたに「精度保証」の項が設けられており、システムとしての精度保証が発展することが望まれる。ここでは、まず日本における抗酸菌検査と精度保証の現状について検討した。

わが国における抗酸菌検査は、そのほとんどが旧国立療養所等の院内検査室および衛生検査所（検査センター）で実施されているものと思われた。そこで、結核病床を有している病院および微生物検査実施を届け出ている検査センターを対象とし、抗酸菌塗抹、培養、同定、感受性検査、核酸増幅法にかかる一連の抗酸菌検査実施状況や精度保証活動内容を把握するためのアンケート調査を実施した。具体的には、病院および検査センター用に2種類の調査票を準備し、各設問に対して選択式の回答を得た。また、その際調査の信頼性のため、調査結果については一切匿名化し、施設名は公表しないことを文書にて明示した。2003年時点で結核病床を有している病院390施設および微生物検査実施を届け出ている検査センター397施設を対象として調査依頼を行い、それに

より、最終的に291（74.6%）の病院検査室と288（72.5%）の検査センターから回答を得た。平均は73.6%（579/787）であった。

結果として、病院検査室の99.7%（290/291）が抗酸菌検査を実施していたが、塗抹から培養・同定・薬剤感受性検査および核酸増幅法をすべて自施設で実施していたのは27.1%（79/291）であった。塗抹・培養は80%以上の施設が実施していたが、同定や薬剤感受性検査を実施していたのは半数以下であった。検査センターについては288施設から回答を得たが、そのうち150施設（52.1%）では微生物検査を行っているものの、抗酸菌検査は実施されていなかった。他の138の検査センターでは1施設を除いて塗抹検査を実施しており、培養検査も87.0%（120/138）で実施されていた。しかしながら、薬剤感受性検査は65施設（47.1%）のみで実施されており、核酸増幅検査については47施設（34.1%）でのみ実施されていた（Table 1）。

病院検査室と検査センターの両者を合計すると、2002年の全国の検査実施数は、塗抹検査が143万件、培養が151万件、菌種同定が9.1万件、薬剤感受性検査が7.4万件、核酸増幅法が約60万件であった。アンケート回収率から、これが日本全国のおよそ4分の3を反映していると仮定すると、塗抹・培養検査は年間約200万件実施されていると考えられた。

Table 1 Type of laboratory and examinations performed (multiple answer)

Examination	Number of laboratory (%)	
	Hospital (n=243)	Commercial (n=138)
Smear microscopy	243 (100)	137 (99.3)
Culture	211 (86.8)	120 (87.0)
Species identification	122 (50.2)	77 (55.8)
Drug susceptibility testing	134 (55.1)	65 (47.1)
Nucleic acid amplification	96 (39.5)	47 (34.1)

続いて各検査法について検討した。塗抹検査については、迅速性のために直接法を実施している施設は病院と検査センターでそれぞれ70.8% (172/243)と81.0% (111/137)であった。一方、集菌法実施がそれぞれ40.3% (98/243)と29.9% (41/137)あり、両方を実施している施設もそれぞれ11.1%と10.9%であった。定期的な染色液のチェックは病院では33.0%、検査センターでは69.3%で行われていたが、病院では72.8% (177/243)で検査時染色コントロールを実施していないと回答した。塗抹検査の結果は、病院では97.5% (234/240)、検査センターでは80.3% (110/137)で24時間以内に報告されていた。

培養検査については、回答(複数回答)を得た病院検査室206施設と検査センター118施設の全施設で固型培地を利用しており、病院では43.7% (90/206)、検査センターでも28.0% (33/118)で液体培地も使用されていた。塗抹陽性における培養陽性率が90%以下の施設が病院で49.7% (103/207)、検査センターで33.0% (38/115)あり、雑菌混入率が適正な値といわれている2~5%となっていたのは病院検査室で43.1% (90/209)、検査センターで39.0% (46/118)であった。培養陽性の結果報告までの期間が平均2週間以内であったのは、病院で15.3% (32/209)、検査センターで4.2% (5/118)であった。病院の96.6% (199/206)および検査センターの72.4% (76/105)で培養コントロールが実施されていなかった。

抗酸菌菌種同定検査については遺伝子ベースでの同定が推奨されているが、病院検査室の15.6% (19/122)と検査センターの75.8% (50/66)でいまだにナイアシンテストが実施されていた。これは臨床からの要求によるものと考えられた。

薬剤感受性検査時に標準株をコントロールとして同時に試験していた施設は病院で31.8% (41/129)、検査センターで43.6% (17/39)であった。感受性検査結果の報告は米国CDCの勧奨では1カ月以内となっているが、これを満足したのは、病院では17.3% (23/133)、検査センターでは18.8% (9/48)であった。

核酸増幅法についてみると、この当時多くの施設はアンプリコアを利用しており、陽性・陰性の反応コント

ロールを毎回実施しているのは病院で82.3% (79/96)、検査センターで96.2% (25/26)であった。

外部精度評価の実施についてTable 2に示した。病院検査室の60.0% (145/243)、検査センターの46.7% (64/137)が外部精度評価の実施なしと回答したが、塗抹検査では検査センターの40.9% (56/137)が、核酸増幅法では病院の34.6% (84/243)と検査センターの23.4% (32/137)が参加経験ありと回答した。核酸増幅法で外部精度評価の実施が比較的多かったのは、精度評価を行う研究会の存在と、検体の準備が比較的容易であることによるものと思われた。

精度保証の一環として検査室環境について質問した結果、細菌検査室を分離・独立させている施設は病院で92.6% (225/243)、検査センターで100% (138/138)であった。安全キャビネットの使用率は病院で80.2% (194/242)、検査センターで79.3% (107/135)であったが、薬剤感受性検査を実施する際の安全キャビネット使用はそれぞれ93.3% (125/134)と90.6% (58/64)であった。しかしながら、検査技師の健康診断を実施していないと回答した施設が病院で13.2% (31/235)、検査センターでも9.0% (12/133)あった。抗酸菌検査に関するトレーニングについても、定期的に参加しているのは病院では0% (0/226)、検査センターでも3.2% (4/124)であった。

2003年時点での抗酸菌検査実施状況について調査したところ、集菌法の実施が増加しており、液体培地での培養実施も進んでいた。この傾向は現在も続いていると考えられる。抗酸菌検査精度保証の実態は、内部精度管理・外部精度評価ともに不十分なものであり、特に塗抹、培養、薬剤感受性検査における精度管理用検査コントロールの実施は低率であった。外部精度評価は核酸増幅法では比較的高率に実施されていたが、他の検査については低率であった。これはパネルテスト等に関する具体的な方法が確立されていないことや、実施に必要な経費等の問題によるものと考えられた。また、検体の質の保証、検査コントロールの重要性の認識、トレーニング(初期あるいはリフレッシュ)に対する意欲なども不十分かと思われた。

Table 2 Implementation of external quality assessment (multiple answers)

Examination	Number of laboratory (%)	
	Hospital (n=243)	Commercial (n=137)
Smear microscopy	18 (7.4)	56 (40.9)
Culture	6 (2.5)	18 (13.1)
Species identification	9 (3.7)	14 (10.2)
Drug susceptibility testing	10 (4.1)	24 (17.5)
Nucleic acid amplification	84 (34.6)	32 (23.4)
No external assessment	145 (60.0)	64 (46.7)

精度保証の基本は、再検査やパネルテストによる現状の把握を実施し、その結果に基づいて改善活動を行い、再度テストを行って改善を確認し、これを一つのサイクルとして繰り返すことにある。抗酸菌検査は現在も広範

に実施されており、感染症法の改正にも鑑みて、安全な検査環境と系統的な精度保証システムが必要と考えられた。

2. 今回の結核菌検査指針改訂のポイント

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 阿部千代治

1. 安全管理

結核菌検査にはエアロゾル発生頻度の高い操作が多いこともあり、濃厚な検査材料を毎日取り扱う検査技師の結核発病率は一般の人より数倍高い。結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアルにみるように、結核菌群に属する菌はバイオセーフティレベル3、ほとんどの非結核性抗酸菌はレベル2に分類されている。また公布された感染症法では結核菌は4種病原体、多剤耐性結核菌は3種病原体に分類されており、結核菌検査はクラスⅡの安全キャビネットを備えたレベル2以上の設備のもとで行わなければならない。検査室内では専用のガウン、N95マスク、ディスポーザブル手袋を着用する。作業に当たってはエアロゾル発生の最も少ない方法を選択する。作業終了後に安全キャビネットや実験台を噴霧消毒し、その後殺菌灯を点灯する。使用後の材料や器具は高圧蒸気滅菌処理をする。またバイオテロを防ぐために分離された結核菌は鍵のかかる部屋または保管庫で保存しなければならない。検査に従事する検査技師は採用時または細菌検査室への配置前に QuantiFERON-TB 検査を受ける。ハイリスクグループでは年2回の定期健診を受ける。

2. 検査の方法

(1) 検査材料および検査回数

提出された喀痰が適切なものかどうかは検査の精度を保持するうえで重要である。第2章「検査材料」の項に「採痰指導」が加えられた。8～24時間間隔で3回喀痰を採取、少なくとも1回は早朝痰を採取する。但し初回の検査で2+以上であれば3回の検査は必要ない。幼児や高齢者などで喀痰の排出が困難な場合に誘導喀痰や胃液の検査をすることは有効である。3回の塗抹検査が陰性の場合に塗抹および培養検査を行った日とは別の日に気管支鏡を用いた検査を保険診療で行うことができる。

(2) 塗抹検査

均等化・遠心集菌材料の塗抹を勧める。本指針では剝離対策のために剝離防止処理したスライドの使用を勧め

ている。「新結核菌検査指針2000」で推奨したことで塗抹検査に蛍光法を取り入れた施設が増加した。蛍光染色として、オーラミンO染色に、新たにアクリジンオレンジ染色法が取り上げられた。オーラミンは菌体周囲の脂質を染色するのに対し、アクリジンオレンジは核酸を染色する違いがある。

(3) 検体の前処理

前処理の目的は検査材料を消化・均等化し、含まれる雑菌を殺し抗酸菌のみを選択的に培養することにある。NALC-NaOH処理のみでは汚染が除去できない検体があること、1つの検体を一般細菌の培養にも使用するケースがあることなどから、セミアルカリプロテアーゼによる消化・均等化が推奨されている。また遠心補助剤を使用した前処理法など新たに開発された前処理法の有効性が証明されており、この改訂書に加えられた。

(4) 培養検査

迅速な検査結果の報告が求められている。発育インジケーター付液体培地として、KRD培地が加えられた。抗酸菌自動培養システムとして、BACTEC MGIT 960、バクテアラート3D、BACTEC 9000自動血液培養システムが取り上げられている。本検査指針では初回分離に液体培地と卵培地(固形培地)を1本ずつ用いることを勧めている。しかし、検査室の受容力や液体培地の価格の問題があることから施設内で検討する。3回の培養に液体培地のみを用いるのではなく、1回は固形培地を用いる。

(5) 分離抗酸菌の鑑別・同定

結核菌と非結核性抗酸菌の早期の鑑別は適切な患者管理と治療のうえで重要である。結核菌群特異抗原をイムノクロマトグラフィーにより検出するキャピリアTBは簡便であり、液体培地と併用することにより迅速かつ簡便に結核菌と非結核性抗酸菌を鑑別でき有用である。液体培地の導入により非結核性抗酸菌の分離頻度が高まった。現在100種以上の抗酸菌種が報告されており、従来からの培養・生化学的性状や市販の遺伝子診断キットでそれらを同定することは不可能である。複数の遺伝子の塩基配列を決定し同定する方法が報告されている。検査

可能な施設に同定を依頼する必要がある(第5章「抗酸菌の同定」を参照)。

(6) 遺伝子検査

初回診断時の3日間の塗抹および培養検査に加え、核酸増幅法による検査を1回保険診療で行うことができる。喀痰塗抹陽性例では患者管理のうえで結核か非結核性抗酸菌かを早急に鑑別する必要があり、検体入手後1~2日で結果が得られる核酸増幅法による検査は有効である。「新結核菌検査指針2000」の出版後に体外診断薬として承認、保険収載されたコバスTaqMan MTB, TRCRapid M.TB, 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子同定検査が改訂書に加えられた。“非結核性抗酸菌症の診断において核酸増幅法はあくまで補助的診断であり診断基準に含めない”とする非結核性抗酸菌症対策委員会の見解から、塗抹陰性の場合に*M. avium*または*M. intracellulare*の検査は行わない。

(7) 薬剤感受性検査

日本結核病学会が小川培地を用いる比率法を承認し、標準法として使っている。小川培地を用いる比率法は結核菌ならびに*M. kansasii*の抗結核薬に対する感受性検査法である。*M. kansasii*以外の非結核性抗酸菌について、小川培地を用いる薬剤感受性検査は行わない。これは感受性検査結果と臨床応答との間に関連はみられないからである。

薬剤感受性検査は最も精度管理の難しい検査である。

米国のCLSIは精度を保持するために寒天培地または液体培地の使用を勧めている。わが国でも検査精度に加え迅速性が重視され、液体培地が取り入れられつつある。この改訂書でもBACTEC MGIT 960 AST, マイクロプレートを用いるMIC測定法などが取り上げられた。

(8) 精度保証

検査精度をチェックするために精度管理テストは必須である。日常行う内部精度管理に加え、定期的に外部施設による精度管理も取り入れる必要がある。実施している施設と連絡先が記述された。

3. 今求められている検査

1980年代の中期から1990年代の初期にかけて米国の結核罹患率が急増した。特にHIV感染に伴う結核は診断が難しいうえに病気の進行が速いこともあり、米国のCDCは検査室に迅速な結果報告を求めた。その目標は、塗抹の結果を24時間以内・培養の結果を21日以内・感受性結果を30日以内に担当医に報告するというものである。現在入院期間の短縮が求められている。そのためには感受性結果をできるだけ早く報告する必要がある。

検査結果は患者管理や治療に結びつくことから迅速性に加え高い精度が要求される。精度の善し悪しは新たに耐性菌を作ることにもつながる。定期的な内部精度管理が求められる。

3. 良質な検体とは—喀痰採取の方法等について—

京都大学医学部附属病院検査部 樋口 武史

はじめに

良質な喀痰の採取方法として採痰指導を取り上げ、その有用性について解説する。また「結核菌検査指針2007」の第2章「検査材料」、および第3章「塗抹検査」の変更点についても併せて概説する。

採痰の原理

細気管支などの末梢付近にある喀痰を体外に排出するには、その気管支の奥(肺胞側)に空気を送り込み、腹筋などを利用することにより空気を圧縮して喀痰を気管支のほうへ押し上げて排出する方法と、気管支を拡張させて肺胞まで空気を十分に送り込み、気管支内壁に付着した喀痰を剥ぎ取るようにして排出する方法がある。いずれの方法も、深呼吸によって肺全体の容積を拡張させ十分に空気を取り入れることがポイントである。肺のす

みずみまで十分に空気を取り込まれた状態から腹筋を一気に収縮させ咳嗽させる。このとき、約200 cmH₂Oに高められた気道内圧で気管に生じる気流速度は、約1,000 km/hに達することが知られており、これはジェット気流に匹敵する速度である。この気流を効率よく利用することで、喀痰は気道へと押し上げられ体外に排出される(Fig.)。この原理に基づいた呼吸運動を行わなければ容易に痰を排出することはできない。具体的には痰を排出させる手段としてスクイーピングなどの理学療法を習得することがポイントになる。

採痰指導の有用性

2000年9月1日から2001年8月31日の1年間に呼吸器内科外来を受診した患者163人(指導無群)と2001年9月1日から2002年8月31日の1年間に同外来を受診した患者161人(指導有群)から採取した喀痰について

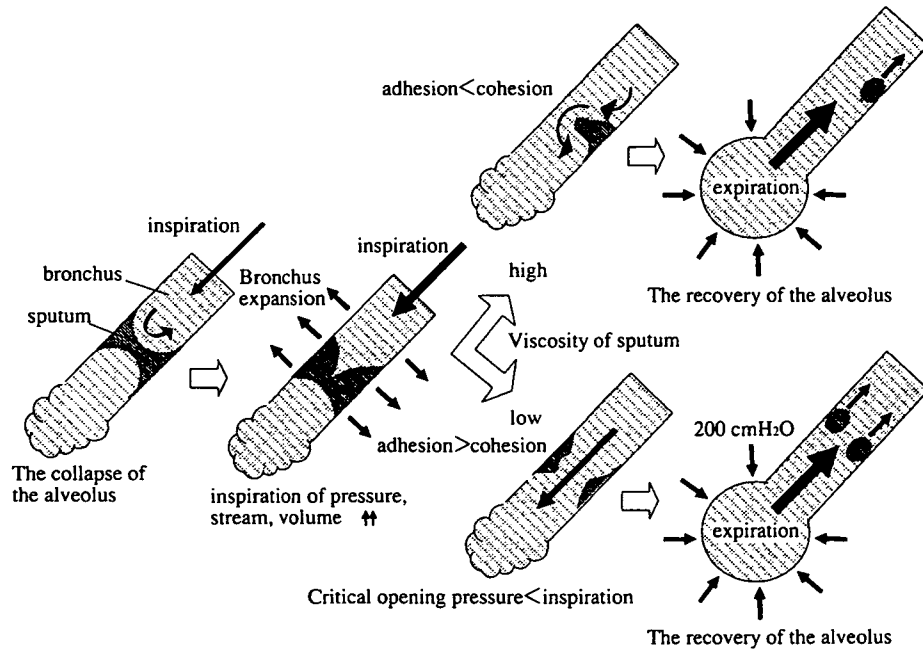


Fig. The mechanism of expectoration

採痰指導の有用性を評価した。その結果、M1 および P1 喀痰は、指導無群では21.5%，21.5%，指導有群では8.1%と36.6%であった。M2, P2, P3 喀痰は両群で大きな差を認めなかった。塗抹陽性率は、指導無群10.4%，指導有群21.1%であった。M2, P1, P2 の肉眼的性状別での陽性率は、指導無群で11.1%，11.4%，30.8%で、指導有群では17.6%，28.8%，26.3%であった。これらの塗抹陽性患者（指導無群17名，指導有群34名）での空洞の有無，病巣の拡がりから判定した胸部X線所見で、指導無群は指導有群に比べて空洞型で中～高範囲の病巣を有する重症型を多く含んでいた。この結果から採痰指導有群で見られた喀痰の肉眼的性状や塗抹陽性率の向上は、患者重症度の差に由来する可能性は否定された。採痰指導は、塗抹陽性率を向上させるのに有用であることが証明された。

「結核菌検査指針2007」の変更点

第2章「検査材料」の変更点

検体の品質管理が重要であることを強調し、特に喀痰採取の方法として採痰指導の項目を付記した。検体およ

び菌株の輸送に関する項目を第8章「精度保証」へ移動した。

第3章「塗抹検査」の変更点

塗抹標本の剝離対策として推奨していたタンパク液に替え、MASコートやAPS（シラン）コートなどの剝離防止処理したスライドガラスの使用を推奨した。染色はオーラミンO蛍光染色法を推奨した。ただし、オーラミンOは発癌性物質であるため、試薬の安全性、安定性が優れているアクリジンオレンジ染色法を新たに追加した。塗抹結果の記載法の一部を訂正した。

まとめ

結核の確定診断には、感染病巣から採取された検体を用いて細菌学的に結核菌を証明することが重要である。喀痰は品質管理上最も重要かつ難しい検体であり、医療従事者は患者の病態を反映した検体が採取できるように最大限努力する必要がある。したがって、採痰指導などのいろいろなアプローチを行い、積極的に喀痰採取に関与することが抗酸菌検査の精度向上に大きく関与する。

4. 抗酸菌の培養・同定に関する最新情報

広島県環境保健協会 斎藤 肇

はじめに

抗酸菌の分離培養は、塗抹染色よりも感度が高く菌を検出でき、また分離菌の鑑別・同定や薬剤感受性試験などを行うことができる。以下にこれらのうち、分離培養法ならびに従来法による分離菌の鑑別・同定法について、最新情報をまじえながら述べる。

I. 分離培養法

[A. 前処理法]

喀痰などの汚染検体を消化・均質化し、混在する抗酸菌以外の細菌を殺して (decontamination)、抗酸菌のみを選択的に培養する方法で、NALC-NaOH法が広く用いられてきた。最近では、検体をあらかじめセミアルカリプロテアーゼ (商品名: スプタザイム, プレソルブ) で溶解・均質化し、NALC-NaOH溶液が効率よく作用し、かつ、分離培地の雑菌汚染の低減を図ろうとする方法が推奨されている。分離培養を行うにあたっては、所定濃度の水酸化ナトリウム溶液を用い、かつ検体の処理時間に留意すべきである。

(1) N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法

NALC-NaOH (終末1~2%) 溶液で喀痰を消化・汚染除去し、リン酸緩衝液で希釈後、3,000×g, 20分遠心し、沈渣を少量の同種緩衝液に再浮遊させて、培地へ接種する方法である。NALC-NaOH液に加えてあるクエン酸ナトリウムは喀痰中に存在するであろうNALCの不活化重金属イオンをキレートし、NALCに安定性を与えるものである。本法は米国CDCで開発され、推奨される方法である。

(2) 抗酸菌検出用キット“ニチビー” (ニチビー法)

CC-Eキット (前処理液) と遠心集菌剤 (K-8) よりなる。CC-EキットはCC-E液 (喀痰膨潤剤加2%NaOH) とCC-E助剤 (長期安定型NALC溶液) からなり、喀痰処理時間の短縮と処理能の増強とを図ったものである。処理喀痰をリン酸緩衝液で希釈し、K-8 (塩化ポリアルミニウム) を加えると、陰性荷電の菌体と陽性荷電のK-8とが凝集物を作るため、菌を低速 (1,600×g), 短時間 (5分) で濃縮でき、沈渣をリン酸緩衝液に再浮遊後、培地へ接種する。

われわれが本法およびNALC-NaOH法で処理した喀痰380検体をMGIT 960システムおよび2%小川培地で

培養した際の抗酸菌検出成績は、両検体処理法間に有意差を認めなかった。

(3) 抗酸菌検査用喀痰前処理キット セントラップMB「ニッスイ」

喀痰をA試薬 (NALC-NaOH溶液) で処理後、B試薬 (吸着担体生成試薬) を加え、生じた白濁不溶性沈殿物を2,000×g, 10秒間遠心し、沈渣をC試薬 (懸濁試薬) へ再浮遊し、培地へ接種する。

[B. 培地]

わが国で用いられている抗酸菌の分離培地は、固型培地としては小川培地、液体培地としてはMGITが広く用いられているが、マイクロコロニーの早期検出と形態観察、集落形成単位 (CFU) の測定には寒天をベースとした平板培地が有用である。この場合、CO₂ふらん器内での培養が必要である。

われわれは、NALC-NaOH処理喀痰431例についてのKRD培地“ニチビー” (液体培地) による抗酸菌分離培養成績がBACTEC 960 MGITシステムと遜色なく、小川培地よりも有意にすぐれていることを報告している。

初診時における3回連続検痰に用いる培地の組合せは検査施設の事情により異なるが、発育支持能と迅速性にすぐれた液体培地と固型培地 (2%小川培地) との併用が望ましく、以下のような組合せが考えられよう。

①3回とも液体培地と小川培地の併用、②2回は液体培地と小川培地の併用・1回は小川培地のみ、③1回は液体培地と小川培地の併用・2回は小川培地のみ。他方、液体培地使用困難な施設では小川培地を主軸とし、塗抹陰性であっても結核の疑いが強い場合、あるいは塗抹陽性であっても治療上あるいは疫学上、結核菌を早期に検出・同定することが強く望まれる場合には液体培地を併用することが望ましい。

II. 同定

抗酸菌を迅速に同定することは、患者の治療方針の決定のためのみならず、疫学面からもきわめて重要である。

[A. 抗酸菌種]

承認・提案されている抗酸菌種をヒトに対する起病性別にみるとTable 1に示すようである。

1. *Mycobacterium tuberculosis* complex (結核菌群)

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* に加え、近年 *M. canettii* (van Soolingen D, et al. 1997), *M. pinnipedii*

Table 1 Description of mycobacterial species

Category group	Involvement in human disease						
	Common	Rare		None			
Slowly growing mycobacteria	TB complex	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> * <i>M. africanum</i> *	<i>M. microti</i> <i>M. caprae</i> <i>M. canettii</i>	<i>M. pinnipedii</i>			
		Nontuberculous mycobacteria	I*	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>		
	II		<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> * <i>M. ulcerans</i> *	<i>M. gordonae</i> <i>M. heckeshornense</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. shinshuense</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. bohemicum</i>	<i>M. interjectum</i> <i>M. nebraskense</i> <i>M. palustre</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. parmense</i> <i>M. saskatchewanense</i>	<i>M. botniense</i> <i>M. cookii</i> <i>M. doricum</i> <i>M. farcinogenes</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. kubicae</i> <i>M. tusciae</i>	
	III		<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> *	<i>M. branderi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i>	<i>M. triplex</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. lacus</i> <i>M. sherrisii</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> <i>M. gastri</i> <i>M. lepraemurium</i> <i>M. montefiorensis</i> <i>M. shottsii</i> <i>M. triviale</i>	
Rapidly growing mycobacteria	Nontuberculous mycobacteria	IV	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> <i>M. goodii</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. boenickei</i> <i>M. brisbanense</i> <i>M. canariensis</i> <i>M. conceptionense</i> <i>M. elephantis</i> <i>M. houstonense</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. manitobense</i> <i>M. massiliense</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. novocastrense</i> <i>M. parmense</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. septicum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. wolinskyi</i>	<i>M. agri</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. album</i> <i>M. alvei</i> <i>M. aurum</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. brunae</i> <i>M. chitae</i> <i>M. chlorophenicum</i> <i>M. confluens</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. fallax</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. frederiksbergense</i> <i>M. gadium</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. hackensachense</i>	<i>M. hassiacum</i> <i>M. hodleri</i> <i>M. holsaticum</i> <i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. moriokaense</i> <i>M. murale</i> <i>M. obuense</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. poriferiae</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. vanbaalenii</i>

(Boldface) Previously reported mycobacteria associated with human diseases in Japan.

*Mycobacteria frequently involved in human disease in some particular counties or areas. *M. leprae* can not be cultured *in vitro*.

"*M. visibilis*" is usually difficult in cultivation.

*Runyon's classification.

(Hajime Saito, 2007).

(Cousins DV, et al. 2003), *M. caprae* (Proding WM, et al. 2005) が報告されている。いずれもヒトに対して病原性を有する。

2. Nontuberculous mycobacteria (非結核性抗酸菌)

主として、肺結核類似症の原因菌として、稀に分離される抗酸菌について、自験例を中心に簡単に述べる。

(1) I 群菌

新種として *M. intermedium* (Meier A, et al. 1993) が報告されているが、集落は光発色性ではなく、暗発色性で、II 群菌である。著者らもその 1 例を報告している。

(2) II 群菌

① *M. lentiflavum* (Springer B, et al. 1996) : 脊椎椎間板

炎病巣から分離・命名された。岩本・著者らは肺疾患患者の喀痰・気管支洗浄液から分離された 8 株を本菌と同一種とし、これらを 3 遺伝子型に分類した。

② *M. heckeshornense* (Roth A, et al. 2000) : *M. xenopi* にきわめて近似した表現型性状を有し、また DDH テストでは *M. xenopi* と同定される。著者らは、わが国で分離・保存されている *M. xenopi* 12 株中 6 株を *M. heckeshornense* と同定した。両菌種はアリルスルファターゼテスト (3 日法)、16S rDNA 配列決定により鑑別可能である。

③ *M. ulcerans* (MacCallum P, et al. 1948) と *M. shinshuense* (Tsukamura M, Mikoshiba H, 1982) : *M. shinshuense* と *M. ulcerans* の異同性については未だ明らかでない。共に毒

性脂質マイコラクトンを産生し、ヒトの進行性皮膚潰瘍をおこす。両者は、地理的分布、若干の生化学的・分子遺伝学的性状を異にする。*M. shinshuense* 感染症は日本（4例、うち1例はNHO東広島医療センター症例）および中国（1例）からの報告例がある。

(3) III群菌

① *M. avium* complex : MACには *M. avium* (subsp. *avium*, subsp. *paratuberculosis*, subsp. *silvaticum*, subsp. *hominissuis*), *M. intracellulare* および *M. chimaera* (Tortoli E, et al. 2004) が含まれる。*M. avium* 肺感染症は東・北日本に、*M. intracellulare* 肺感染症は西日本に多いことを著者ら（1989年）がはじめて明らかにし、諸家により追認されてきたが、佐藤（名古屋市大）が2001年および2007年の2回にわたり行った全国アンケート調査で、西日本でも *M. avium* 感染症の増加が認められている。

最近、岩本・著者らにより、MACのうち、MACプロープ反応性・両種特異プロープ非反応性菌株の分類学的研究が進められており、興味ある知見が得られている。

② *M. malmoense* (Schröder KH, Juhlin I, 1997) : 自験例は、発育至適温度30℃、*M. malmoense* 基準株 ATCC 29571と100%一致した16S rDNA配列、*M. malmoense* のミコール酸のHPLCパターンを示した。

③ *M. celatum* (Butler WR, et al. 1993) : 自験3症例からの分離菌は、いずれも、S型、25~45℃で発育、ミコール酸のHPLCパターンは *M. celatum* に近似、16S rDNA配列は *M. celatum* N224（臨床分離株、2型）と99.8%、同 ATCC51131（基準株、1型）と97.3%の相同性を示し、

M. celatum 2型と同定された。

④ *M. triplex* (Floyd MM, et al. 1996) : 自験2例よりの分離菌は、ともにS型、25~37℃で発育、ミコール酸のHPLC分析では *M. simiae* に近似パターンを示したが、16S rDNA配列は *M. triplex* ATCC700071と100%の相同性を示した。

⑤ *M. genavense* (Böttger EC, et al. 1993) : 低免疫グロブリン血症、全身リンパ節腫大を有する患者の頸部リンパ節の生検で、無数の抗酸菌を認めたが、2%小川培地には発育せず、MGITに発育した。諸種液体培地ならびにマイコバクチン加 Middlebrook 7H11寒天（微小集落）に継代可能であった。*M. genavense* Wee 0268/96の16S rDNA配列と100%の一致をみた。

⑥ *Mycobacterium* sp. わが国で12例の肺疾患患者喀痰より分離され、培養・生化学的性状、ミコール酸のHPLC分析、16S rDNA配列決定などの諸成績より、未だ記載をみない抗酸菌と決定した。

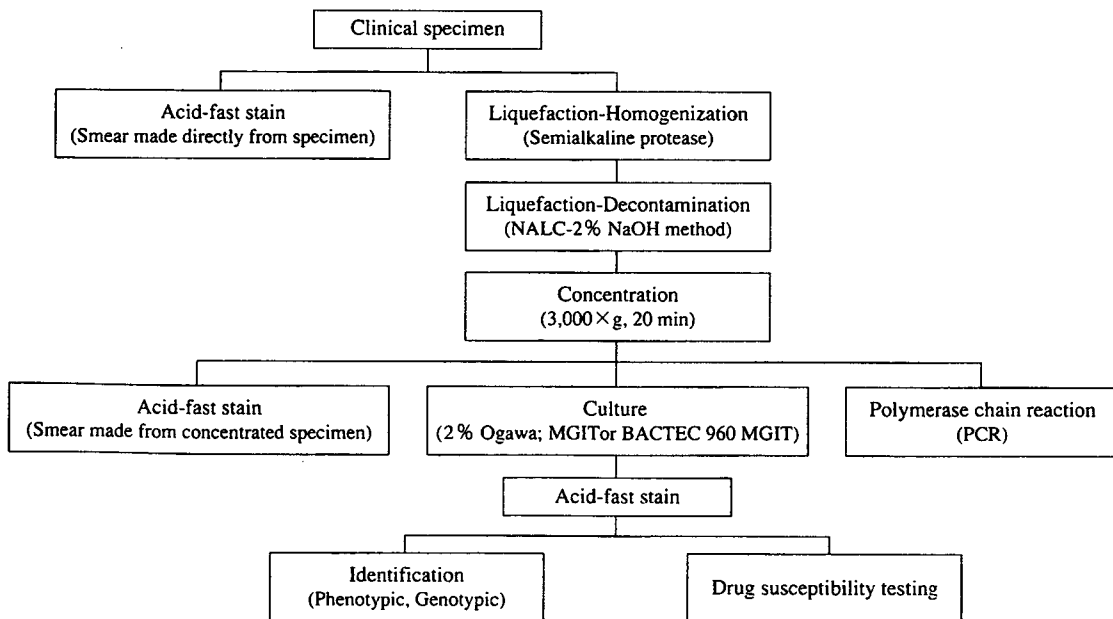
(4) IV群菌

M. mageritense (Domenech P, et al. 1997) : 膿胸の患者喀痰から分離された、S型、非光発色性、25~42℃で発育する迅速発育菌で、生化学的・分子遺伝学的諸性状より *M. mageritense* と同定した。

[B. 非結核性抗酸菌の鑑別上有用な培養・生化学的性状]

- ①発育速度、②集落形態、③色素産生、④光発色性、⑤発育温度、⑥ Tween 80水解、⑦ウレアーゼ、⑧硝酸塩還元、⑨半定量カタラーゼ、⑩68℃耐熱性カタラー

Table 2 A flow chart of laboratory diagnosis of mycobacteria



ぜ, ⑪アリスルファターゼ(3日法), ⑫サプリメント(ヘミン, マイコバクチンJなど)要求性, ⑬キャベリアTBテスト, など。

〔C. 抗酸菌検査のフローチャート〕

Table 2に示した。

文 献

- 1) Kent PT, Kubica GP: Identification test techniques; Culture examination and identification. In: Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, 1985, 71-157.
- 2) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏: 「結核菌微生物検査必

携 細菌・真菌検査」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F90-F133.

- 3) Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC Jr, et al.: *Mycobacterium*: Phenotypic and genotypic identification. 8th ed., In: Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. (ed), American Society for Microbiology, Washington DC, 2003, 560-584.
- 4) Della-Latta P: Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. 2nd ed. Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington DC, 2004, 7.1.2.1-7.5.3.
- 5) 斎藤 肇: 分離培養法, 抗酸菌の同定, 「新結核菌検査指針2000」. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編, 結核予防会, 東京, 2000, 27-77.

5. 遺伝子検査の現状と将来展望

東北大学病院診療技術部 長沢 光章

はじめに

現在, 抗酸菌用の遺伝子検出試薬には対象菌種や原理の違いのほか, 臨床検体直接検出用(核酸増幅法)や分離菌同定用など種々の方法がある。したがって, 「新結核菌検査指針2000」では核酸増幅法として扱っていたが, 本指針では第6章「遺伝子検査法」として掲載することにした。遺伝子検査法には, 研究レベルのものまで含めると多くの種類や方法があるが, 本章ではわが国で体外診断薬として承認・市販され, 診療保険点数が認められているキットについて記述した。

今回, 「結核菌検査指針2007」における改訂の概要と遺伝子検査の現状, 将来展望について報告する。

1. 種類と用途

現在, 市販されている抗酸菌用遺伝子検出キットを表1に示した。なお, 指針であることから詳細な原理等は文献および各キットに添付の文書を参照していただくことにした。核酸増幅法は, コバスアンプリコアマイコバクテリウム(PCR法:表2), コバスTaqMan MTB(リアルタイムPCR法), DNAプローブ「FR」-MTD(TMA法)およびTRCRapid M.TB(TRC法)について記載した。また, 分離菌株の同定用であるDDHマイコバクテリア「極東」(DNA-DNAハイブリダイゼーション法:表3), アクユプローブ結核菌群同定(HPA法)について記載した。その他に, 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子の検出が可能なフィノスLiPA/Rif TB(PCR法+LiPA法)も記載した。

また, 現在開発中または発売予定の遺伝子増幅法を表4に示した。

2. 核酸増幅法検査の依頼と検体採取・保存

現在, 遺伝子検査は大規模病院を除き多くの施設が臨床検査センターへ外部委託を行っている。これら外部委託時の注意事項を含む検査の依頼, 採取, 保存について記載した。

核酸増幅法検査の依頼は, 日本結核病学会の提言・勧告である①診断時に1回行う, ②核酸増幅法を治療中の患者の経過判定には使用しない, ③検体中の菌量を知ることにはできないので, 非結核性抗酸菌症の診断基準との関連を考えたときに塗抹陰性検体への*M. avium*および*M. intracellulare*用の核酸増幅法検査の使用は留意することなどを考慮し, 原則として, ①塗抹陽性の場合, ②塗抹陰性であるが臨床的に結核を強く疑う場合, ③塗抹陰性で結核を否定する場合とした。

また, 検査材料の採取・保存法として, ①検体は十分量採取し, コンタミネーションのないよう注意する, ②喀痰では, 唾液の混入をさけ, 膿性部分を採取する, ③胸水などはフィブリンの析出により採取後に凝固することが多いため, クエン酸ナトリウムまたはEDTAを添加した容器を使用する, ④ヘパリンは阻害物質のため使用しない, ⑤血液は阻害物質となるため, 混入はできながざり避ける, ⑥検査室で指定された滅菌容器に採取し, 乾燥を避け, 冷蔵保存を行い, 特に検体が外部に漏れないように完全に密封することを記載した。

外部委託時の注意事項として, ①塗抹検査は院内検

表1 遺伝子検出試薬キット一覧(抗酸菌)

平成18年12月現在

対象菌種	診療保険点数の 名称	製品名	販売(製造)会社	原理*1	対象	
					臨床検体 (直接検出)	分離菌 同定
<i>Mycobacterium</i> (結核菌群 を含む抗酸菌18菌種)	抗酸菌群核酸同定 精密検査	DDH マイコバクテリア '極東'	極東製薬工業	DDH	-	○
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (結核菌群)	結核菌群核酸増幅 同定検査	アキュプローブ結核菌群同定	極東製薬工業 (Gen-Probe)	HPA	-	○
		(コバス) 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 グノスティクス	PCR	○	○
		コバス TaqMan MTB		TaqMan PCR	○	○
		DNA プローブ「FR」-MTD	富士レビオ (Gen-Probe)	TMA & HPA	○	-
		結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCRapid M.TB	東ソー	TRC	○	○
<i>Mycobacterium avium</i> complex	マイコバクテリウム アビウム・イン トラセラー核酸 同定精密検査	アキュプローブマイコバクテリ ウムアビウムコンプレックス	極東製薬工業 (Gen-Probe)	HPA	-	○
		DNA プローブ「FR」-MACダイ レクト	富士レビオ (Gen-Probe)	TMA & HPA	○	
<i>Mycobacterium avium</i>		(コバス) アンプリコア マイコ バクテリウム アビウム	ロシュ・ダイア グノスティクス	PCR	○	○
<i>Mycobacterium intracellulare</i>		(コバス) アンプリコア マイコ バクテリウム イントラセラー			○	○
結核菌群 RFP 耐性遺伝子	結核菌群リファン ピシン耐性遺伝子 同定検査	フィノス LiPA/Rif TB	ニプロ (Innogenetics N.V.)	LiPA	-	○
		ジェノスカラー・Rif TB		PCR & LiPA	○	○

*1 DDH: DNA-DNA Hybridization, HPA: Hybridization Protection Assay, PCR: Polymerase Chain Reaction, TMA: Transcription Mediated Amplification, TRC: Transcription Reverse Transcription Concerted Reaction, LiPA: Line Probe Assay

査、遺伝子検査は外部委託の場合、塗抹検査で抗酸菌陽性の場合には必ず情報を提供すること、②輸送時に検体容器の破損がないように指定の容器に採取し、担当者に依頼する、また、菌株の同定依頼時には培地にパラフィルムを巻き、ビニール袋に入れ、検体輸送用容器に入れて提出する、などがある。

3. 測定方法

各測定・試薬キットの添付文書を熟読し、操作マニュアル(手順書)を作成しておくことが必要である。本指針にはPCR法(コバスアンプリコア)とDDH法の喀痰検体の一般的な測定法を掲載した。

4. 施設設備およびバイオハザード対策

核酸増幅法による遺伝子検査を行う場合は、試薬調整、前処理および増幅検出区域を別々にし、使用する器材も区域専用とする。また、結核菌などを扱う場合は空気感染予防策を実行し、クラスII以上の安全キャビネット、安全装置付きの遠心器は必ず整備する必要がある、使い捨て手袋やN95マスクの装着などをして十分に熟練した臨床検査技師が行う必要がある。特に、ピペット操作時におけるエアロゾルの発生には注意する。検体や

表2 塗抹検査、培養検査とPCR法の比較

n=372例	塗抹		
	-	+	
アンプリコア™ マイコバクテリウム	- +	168 77	9 118

(1) 青木ら(1994)、竹内ら(1996)、清水ら(1999)のデータを集計

塗抹	培養	例数	PCR陽性例数(%)
+	+	36	34 (94.4)
-	+	24	17 (70.8)
-	-	54	9 (16.7)

前倉ら(肺結核患者:1998)

増幅産物は0.5%次亜塩素酸に浸潤後に廃棄する。また、実験台や器具の日常清掃や汚染時にも0.5%次亜塩素酸でよく拭き取り、紫外線照射を十分に行う。

また、本学会、日本臨床微生物学会および日本臨床衛生検査技師会の3学会で作成した「結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアル2005」を参照すること。

5. 内部・外部精度管理

内部精度管理として、機器や器材の点検や核酸増幅法

表3 生化学的同定法とDDH法の相関

生化学的同定法	検討株数	一致株数	不一致株数	DDH法での同定菌種(株数)
<i>M. tuberculosis</i>	122	122	0	
<i>M. kansasii</i>	45	45	0	
<i>M. marinum</i>	6	6	0	
<i>M. simiae</i>	6	6	0	
<i>M. scrofulaceum</i>	47	28	19	<i>M. gordonae</i> (9), 同定不能 (5), <i>M. avium</i> (4), <i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. gordonae</i>	24	23	1	<i>M. avium</i> (1)
<i>M. szulgai</i>	4	4	0	
<i>M. avium</i> complex	142	135	7	同定不能 (4), <i>M. kansasii</i> (1), <i>M. szulgai</i> (1), <i>M. chelonae</i> (1)
<i>M. gastri</i>	5	5	0	
<i>M. xenopi</i>	7	7	0	
<i>M. nonchromogenicum</i>	31	15	16	<i>M. terrae</i> (8), 同定不能 (6), <i>M. triviale</i> (2)
<i>M. terrae</i>	2	2	0	
<i>M. triviale</i>	4	3	1	<i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. fortuitum</i>	60	35	25	<i>M. peregrinum</i> (11), 同定不能 (5), <i>M. abscessus</i> (3) <i>M. chelonae</i> (3), <i>M. intracellulare</i> (2), <i>M. avium</i> (1)
<i>M. chelonae</i>	22	17	5	<i>M. abscessus</i> (2), 同定不能 (2), <i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. abscessus</i>	18	17	1	<i>M. chelonae</i> (1)
<i>M. peregrinum</i>	3	3	0	
同定不能	20	18	2	<i>M. gastri</i> (1), <i>M. xenopi</i> (1)

表4 開発中または発売予定の遺伝子増幅法(細菌関連)

1. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法/栄研化学: 結核菌群, 他
2. BDプローブテック ET (SDA法) /日本ベクトン・ディッキンソン: 結核菌群
3. リアルタイムNASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) 法
/日本ビオメリュー: 抗酸菌, 呼吸器感染症パネル, 院内感染症パネル
4. ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法
/宝酒造: 結核菌群, 淋菌, 他

表5 遺伝子検査, 塗抹鏡検および培養検査の結果から考えられる解釈

臨床材料からの核酸増幅法(結核菌群)	塗抹鏡検(抗酸菌染色)	培養(液体培地, 小川培地)	分離菌からの遺伝子検査(結核菌群)	検査結果の解釈
陰性	陰性	陰性	—	結核菌群陰性
陰性	陰性	陽性	陰性	結核菌群以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)
陰性	陽性	陽性	陰性	結核菌群以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)
陰性	陰性	陽性	陽性	結核菌群陽性(菌量少数)
陽性	陰性	陽性	陽性	結核菌群陽性
陽性	陽性	陽性	陽性	結核菌群陽性
陽性	陽性	陽性	陰性	結核菌群(菌量少数)と非結核性抗酸菌が混在の可能性あり
陽性	陽性	陰性	—	死菌(結核菌群)の可能性あり
陽性	陰性	陰性	—	死菌(結核菌群)の可能性または菌量少数またはコンタミネーション

における陽性および陰性コントロール, インターナルコントロール(PCR法のみ)の使用など, 精度管理の重要性の認識を高める必要がある。また, 外部精度管理にも積極的に参加すべきである。

PCR感染症検査研究会の2004年度調査(367施設)では, コントロールの使用方法は33のパターンに分類され, すべてのコントロールをすべての項目で使用している施設は76施設(20.7%)で, コントロールをまったく

使用しない8施設(2.2%), 陰性コントロールを使用しない10施設(2.7%)があり, 精度管理の重要性の認識を高める必要がある。

6. 遺伝子検査による結果の解釈

核酸増幅法には, 反応系を阻害する物質(ヘパリン, 血液など)の存在や不適切な検体などによる偽陰性, コンタミネーションによる偽陽性などの問題がある。また,

死菌やBCG株でも陽性結果になることを念頭に入れ、臨床症状、X線検査、塗抹・培養検査、ツベルクリン反応または QuantiFERON-TB 検査結果などを総合的に判断して確定診断を行うことが重要である。遺伝子検査、塗抹鏡検および培養検査の結果から考えられる解釈を表5に示した。

すべての遺伝子検査において、結核菌は結核菌群として同定され、結核菌とは断定できない。ただし、統計学的には95%以上が結核菌であり、胸部X線像、既往歴など臨床所見と併せて判断する。また、核酸増幅法でも、菌量が少ない場合や検査材料の質、菌の局在などにより

検出できないことがある。さらに、阻害物質により検出できない場合がある。

結 語

遺伝子検査法は、感染症領域における診断・治療に大きく貢献し重要な検査法であるが、様々な課題があることも認識し、臨床側との十分な連携の下に検査を行うことが大切である。そして、塗抹・培養検査および免疫学的検査法なども含め、それぞれの施設に合った感染症検査システムを構築・運用することが必要である。

6. 薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには

順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科 小栗 豊子

はじめに

抗酸菌の薬剤感受性検査は長期の日数を要するため、検査結果を初期治療に役立てることは不可能であった。1994年、CDCは結核菌検査の迅速化を具体的な目標で示し、検査関連施設に改革を勧告した¹⁾。薬剤感受性検査では「15～30日以内の報告」が目標とされ、これを契機に検査法の改良・開発はめざましい発展を遂げ、現在ではこの目標達成に十分対応できる検査法が開発され普及している。

一方、わが国では2000年に「新結核菌検査指針」が出版され、臨床検査室に大きな反響を呼び起こし、抗酸菌検査の刷新と施設間差の是正が図られた²⁾。これに続く今回の改訂で最も重点を置いたことは「迅速化」である。初期治療に役立てるためには迅速報告が不可欠である。また、検査対象の抗酸菌も広く取り上げることは見送り、アウトブレイクや多剤耐性菌の問題で最も深刻な「結核菌」に限定した。薬剤感受性測定法の標準法は以前の指針に採用された1%小川培地を用いる比率法を踏襲し、日常検査法としては迅速に成績が得られる液体培地を用いる方法を推奨することになった。本稿では薬剤感受性検査が不可欠とされる所以である耐性菌の現状に触れたのち、標準法、ならびに日常検査法として推奨される方法の特徴や注意点について述べる。

1. 結核菌の薬剤耐性菌の現状

結核療法研究協議会の2004年の調査報告³⁾によると、結核菌での主要4薬剤の耐性率は、既治療患者由来株では、初回あるいは治療4週以内(以下、初回治療)の患者に由来する株の2～11倍高率であったことが報告され

ている(図1)。また、主要4種の薬剤(INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol)のいずれかに耐性の頻度も既治療例では初回治療例の約3倍と高率であり、さらに、多剤耐性結核菌は、初回治療例では0.7%であったのが、既治療例ではその約13倍の9.8%と高率であった(図2)。耐性菌出現の背景には医

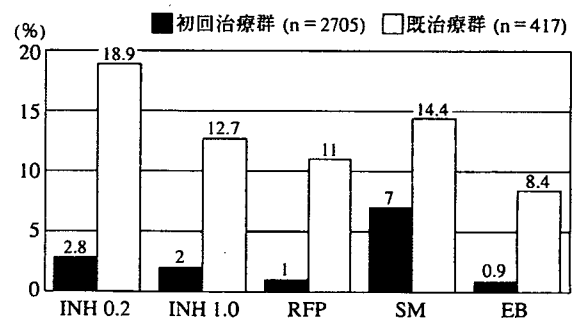


図1 初回治療群と既治療群における耐性菌出現率の比較(結核療法研究協議会, 2004年調査報告)
INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol

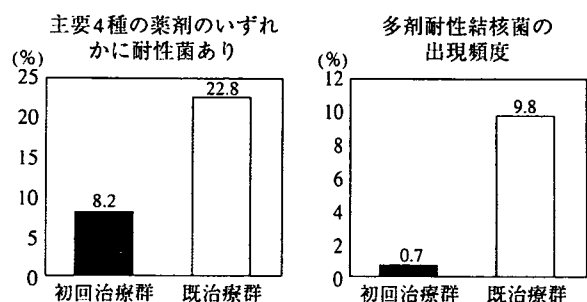


図2 薬剤耐性菌の出現頻度

師の不適切な薬剤処方, 結核患者の不規則な抗結核薬の服用, 治療の脱落などのほか, 輸入感染症としての発症例があげられる。また, 検査側の要因として薬剤感受性結果報告の遅延も関係していると思われる。

多剤耐性結核菌とは INH と RFP の両剤に耐性を示す株であり, これらの耐性菌による結核の治療は困難をきわめ, また, 経済的負担も大きい^{4)~6)}。多剤耐性結核では感受性検査の有用性がきわめて高いとされている。耐性株増加を阻むためにも患者分離株を用いた迅速な薬剤感受性検査結果の報告が不可欠である。特に既治療例では耐性株が多いことから迅速報告が要求される。

2. 薬剤感受性検査法

現在, わが国で用いられている結核菌の薬剤感受性測定法の概要を表1に示した。

1. 測定法の種類

(1) 標準法: 標準法は種々の簡易法開発の基準として用いられている。この方法の欠点は判定までに約4週間

(28日)を要し, 分離培地からの継代菌株を用いる場合はさらに2~3週を要することから, トータルで6~7週(42~49日)を要することになり, 先のCDCの勧告を満たすことはできない。さらに, 小川培地は鶏卵を含むため, 一部の抗結核薬では薬剤の培地への吸着が起これ, 薬剤の添加濃度と実際の抗菌活性を有する薬剤濃度とに差を生じるなどの問題点がある。このほかにも培地に添加する鶏卵やマラカイト緑は培地品質のバラツキの原因となる。アメリカ臨床検査標準委員会(NCCLS, 現在はCLSI)の比率法では寒天培地(Middlebrook 7H10 agar)が用いられている。しかし, わが国での寒天培地を用いた検討は不十分であることから, 現在も1%小川培地(試験管)を用いた方法が標準法である。

(2) 液体培地を用いる方法: BACTEC MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用システム(Becton Dickinson)は Middlebrook 7H9 培地を用い, 自動検出器を使用するので, 検査の所要時間が著しく短縮(4~12日)される^{7)~9)}。この方法は迅速性に優れているが, 判定に専用の機械を

表1 結核菌の抗結核薬感受性検査法ならびに耐性遺伝子検出法

検査法	製造所	使用培地	検査所要日数	抗結核薬	方法の概要
結核菌感受性1濃度培地	極東製薬	小川培地	約4週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS	結核菌を対象, 小川培地を使用, 36±1℃で培養
バクテックMGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ ストレプトマイシン, イソニアジド, リファンピシン, エタンブトール	ベクトン・ディッキンソン	Middlebrook 7H9	4~12日	SM, INH, EB, RFP	結核菌を対象, Middlebrook 7H9を用いた試験管法で, 自動検出機を用いた方法
ウエルバック培地S	日本ビーシー	STC加工藤PD培地	3~4週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS, LVFX, PZA	結核菌を対象, 特殊マイクロトレイを用いたSTC呈色による判定法, 集落の算定可能
結核菌感受性ビットスペクトル-SR	極東製薬	STC加小川培地	2~3週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS, LVFX	結核菌を対象, 特殊マイクロトレイを用いたSTC呈色による判定法, 集落の算定は不可能
結核菌感受性PZA液体培地	極東製薬	Middlebrook 7H9	7日	PZA	結核菌を対象, PZAを含む液体培地で検査する試験管培地法
バクテックMGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズピラジナミド	ベクトン・ディッキンソン	Middlebrook 7H9	4~12日	PZA	結核菌を対象, Middlebrook 7H9を用いた試験管法で, 自動検出機を用いた方法
プロスミックMTB-I	極東製薬	Middlebrook 7H9	7日	SM, INH, EB, RFP, KM, LVFX, SPFX, CPFX	結核菌を対象とした微量液体希釈法
ルシミックMTR-SR	極東製薬	Middlebrook 7H9	5日	SM, INH, EB, RFP, KM	結核菌を対象, 菌体内のATP量を測定, 専用ルミノメーター
フィノスLiPa・RifTB	ニプロ		2時間		結核菌を対象, ラインプローブ法, 喀痰または分離菌株を用いる, 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子(<i>rpoB</i>)検出, 前処理に約4時間, 遺伝子検出に2時間を要する

TH: ethionamide, KM: kanamycin, EVM: enviomycin, CS: cycloserine, PAS: para-aminosalicylic acid, LVFX: levofloxacin, PZA: pyrazinamide, SPFX: sparfloxacin, CPFX: ciprofloxacin