

考 察

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

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

1994年からSRLN内で年1回薬剤感受性検査の精度試験を実施している。INHとRFPの検査精度は試験開始以来比較的良好であったが、SMとEBについては開始初期にはSRLN内の一致率が低かった^{11) 14) 15)}。特にEBは再現性を得ることが難しい薬剤であると考えられている^{7)~10) 16) 17)}。RobertsらはMiddlebrook 7H10寒天培地を用いる比率法をゴールドスタンダードとして比較したときBACTEC 460 TBによるEB検査の感度は66%を超えなかったと報告している¹⁸⁾。今回のMGIT ASTによるEB検査の感度は78.9%であり、他の3薬剤についての検査の感度と比べ明らかに低い値であった。一方、Middlebrook 7H10寒天培地による比率法の感度は100%で

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

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

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

謝 辞

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

文 献

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

- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：抗酸菌検査の精度管理 (3) —検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験の外部精度アセスメント。結核。2005；80：47-48.
- 3) 御手洗聡：検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント。結核。2005；80：349-358.
- 4) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993；31：767-770.
- 5) CDC: National plan for reliable tuberculosis laboratory service using a system approach: recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force on tuberculosis laboratory service. Morbid Mortal Weekly Rep. 2005；54 (RR-6): 1-12.
- 6) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌迅速薬剤感受性検査。結核。1997；72：187-192.
- 7) Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, et al.: Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002；40：150-154.
- 8) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculosis drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol. 2002；40：607-610.
- 9) Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, et al.: Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. J Microbiol Methods. 2004；56：291-294.
- 10) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較。結核。2001；76：657-662.
- 11) 富田元久, 竹野 華, 鈴木克洋, 他: バクテック MGIT 960 による薬剤感受性検査における接種菌量の検討と検査の再現性。結核。2004；79：625-630.
- 12) 古畑由紀江, 菊地勇治, 田澤庸子, 他: BACTEC MGIT™ 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズの基礎的検討。JARMAM. 2004；15：7-13.
- 13) NCCLS: Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS document M24-A, 2003.
- 14) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.2. Prevalence and trend. WHO/CDS/TB 2000. 278. WHO, Geneva, Switzerland, 2000.
- 15) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.3. WHO/HTM/TB/2004. 343. WHO, Geneva, Switzerland, 2004.
- 16) Bergmann JS, Woods GL: Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. J Clin Microbiol. 1997；35：3325-3327.
- 17) Siddiqi SH, Libonati JP, Middlebrook G: Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1981；13：908-912.
- 18) Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al.: Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. J Clin Microbiol. 1983；18：689-696.
- 19) 阿部千代治: 酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討。感染症誌。1996；70：360-365.
- 20) 斉藤 肇, 蝶良英郎, 山中正彰, 他: MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する 10施設での共同研究。臨床と微生物。1997；24：897-903.
- 21) 三浦隆雄, 長谷川直樹, 鈴木紀久雄, 他: MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 抗酸菌検査システムの検出率と迅速性の評価。日本臨床微生物学雑誌。2000；10：125-130.
- 22) Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al.: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1999；37：748-752.
- 23) 青野昭男: 最近の抗酸菌検査: 培養検査 MGIT。臨床と微生物。2001；28：253-261.
- 24) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1999；37：3693-3697.
- 25) Hasegawa N, Miura T, Ishii K, et al.: New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2002；40：908-912.

BACTEC MGIT 960 SYSTEM FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: A STUDY USING
EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT STRAINS

¹Ikuo KOBAYASHI, ¹Chiyoji ABE, and ²Satoshi MITARAI

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

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

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

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

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

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

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

(E-mail: ikuo_kobayashi@bd.com)

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

吉田志緒美¹⁾/鈴木克洋¹⁾/岡田全司¹⁾/富田元久²⁾/坂谷光則³⁾

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

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

はじめに

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

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

対象と方法

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

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

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

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

1. 塗抹陽性培養陰性喀痰材料

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

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

2. NTM混在結核菌株

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

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

3. 方法

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

フィノスLiPA Rif TB(ニプロ)は抗酸菌から抽出,

増幅されたピオチン化DNAを用いて, 結核菌群の *rpoB* 遺伝子内の変異を検出するLine Probe Assayである⁵⁾。10種類のプローブを固相化したストリップにNaOH変性した検体を添加して, ハイブリダイズする。洗浄後, ピオチン-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パック培地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

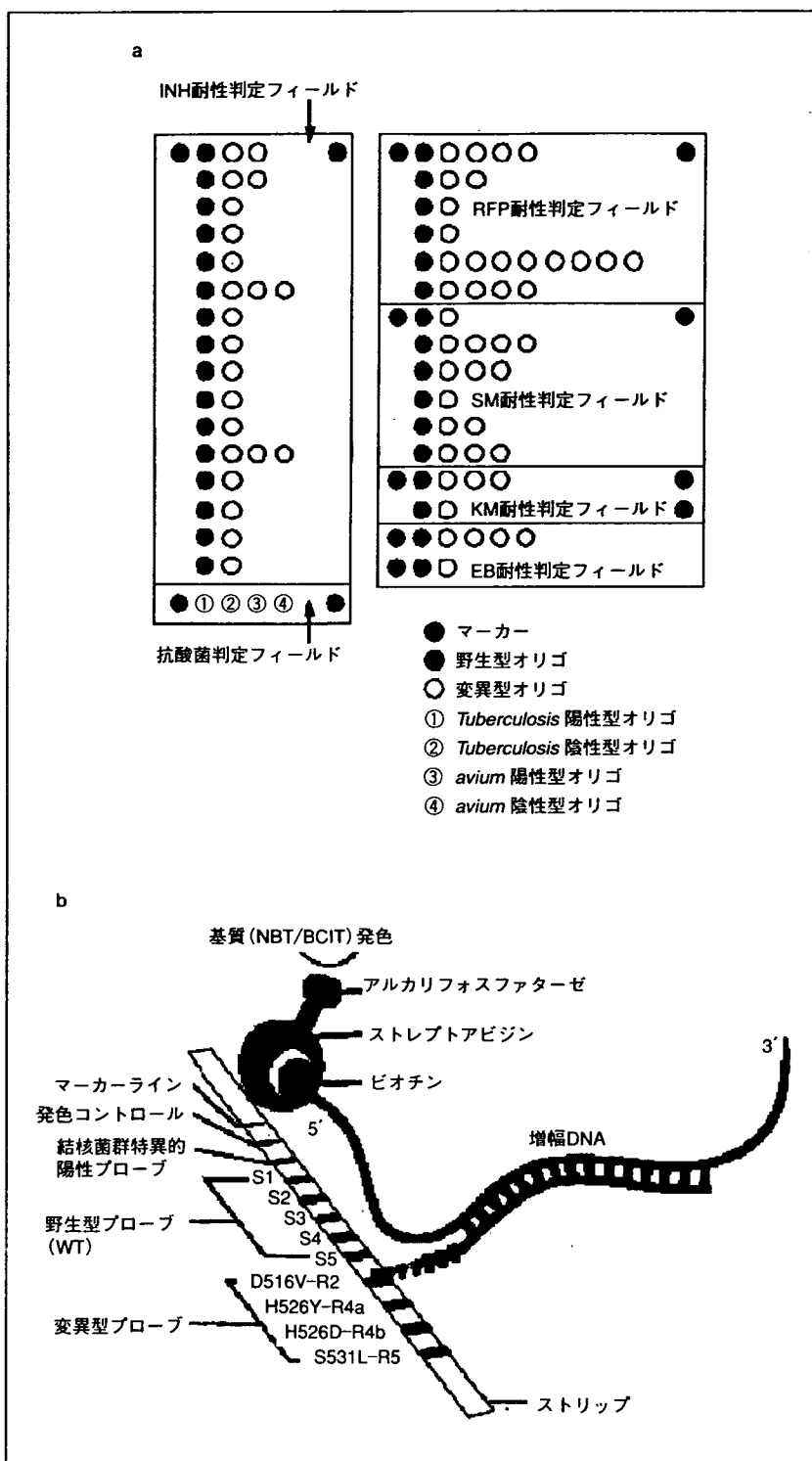


図1 結核菌の薬剤耐性遺伝子検査キット

a : OligoArray-TB(日清紡資料), b : フィノス LiPA Rif TB(ニプロ資料)

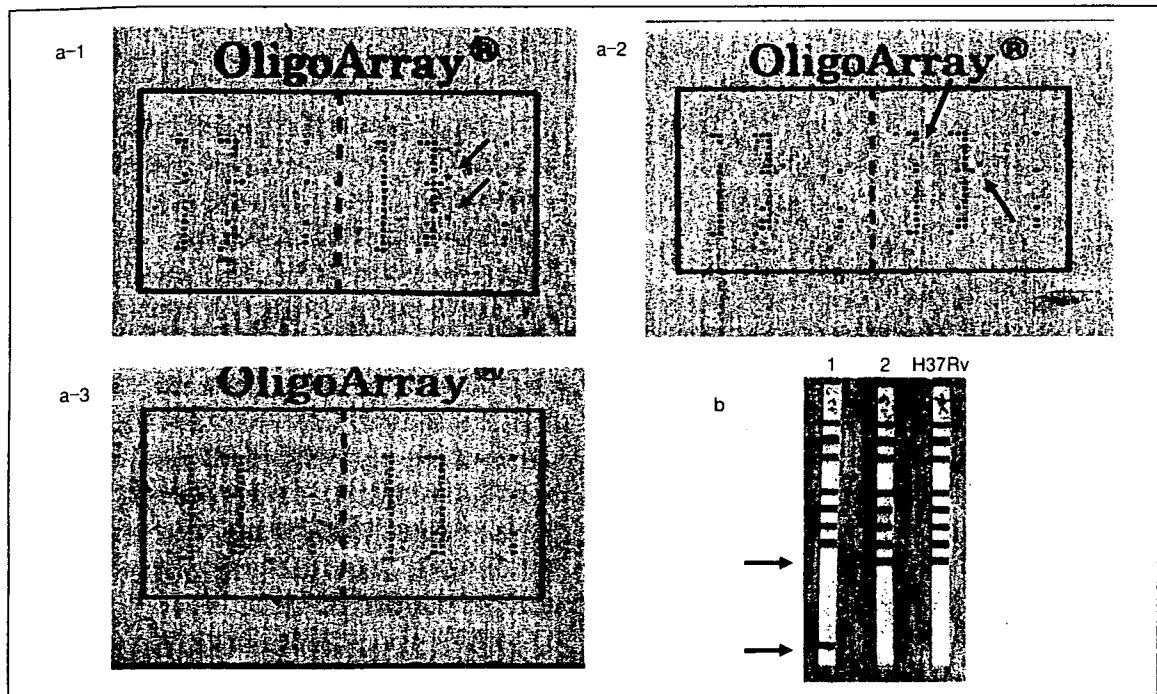


図2 培養陰性喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果

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.

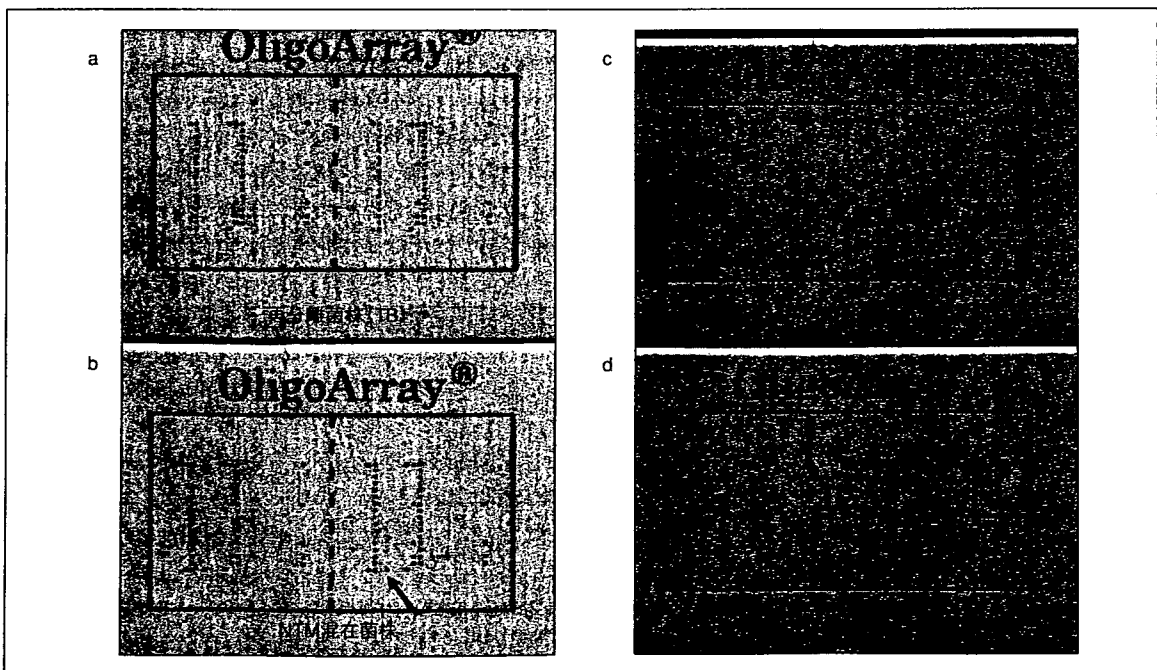


図3 NTM 混在喀痰材料からの耐性遺伝子検査判定結果

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.

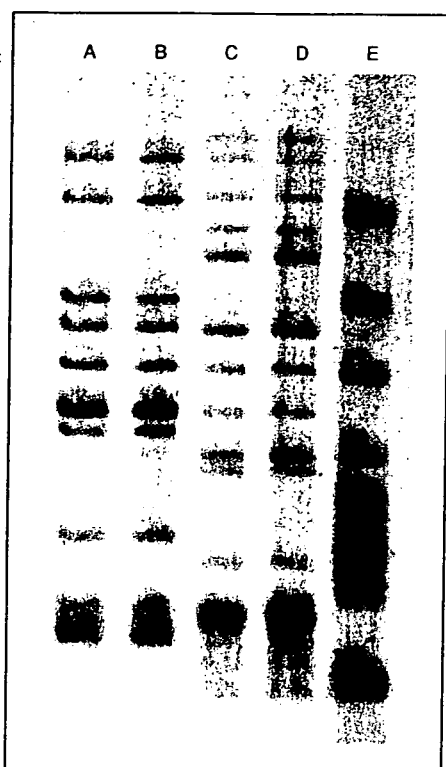


図4 IS6110-RFLP 解析結果
 A: 結核菌分離培養後菌株 A からの DNA,
 B: NTM (*M. avium*) 混在時菌株 A からの DNA,
 C: 結核菌分離培養後菌株 B からの DNA,
 D: NTM (*M. intracellulare*) 混在時菌株 B からの DNA,
 E: 結核菌標準菌株 H 37 Rv.

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、ウエルバック法、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。薬剤感受性試験では、ウエルバック法、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	ウエルバック	OligoArray-TB	フィノス LiPA Rif TB	変異パターン
Control*	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	
2	S	S	S	S	
3	S	S	S	S	
4	S	S	S	S	
5	S	S	S	S	
6	R (INH, RFP)	R (INH, RFP, KM)	R (INH, RFP, KM)	R	S1 欠損
7	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R (INH, RFP, EB, SM)	R	S5 欠損 R5
8	R (RFP)	R (RFP)	R (RFP)	R	S5 欠損 R5
9	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R (INH, RFP)	R	S4 欠損 R4b
10	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S5 欠損 R5
11	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R (INH, RFP, EB)	R	S5 欠損 R5

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

R: anti-*Mycobacterium tuberculosis* drugs resistant

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

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

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

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

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

近年結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析はかなり進められてきたが、いまだすべての変異が解明されていないため、薬剤耐性遺伝子検査キットで検出できない薬剤耐性が存在する。その場合には通常の薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子検査キットの結果に乖離が生じることになる。OligoArray-TBで検出できる抗結核薬耐性遺伝子はRFPでは*rpoB*、INHでは*inhA*、*katG*、SMでは*rrs*、*rpsL*、エタンプトール(EB)では*embB*、カナマイシン(KM)では*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. *防菌防黴* 28 : 561-573, 2000
- 5) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他 : Line Probe Assay(LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核* 75 : 575-581, 2000
- 6) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会 : 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入への提案. *結核* 72 : 597-598, 1997
- 7) 阿部千代治 : 第7章薬剤感受性試験. *新結核菌検査指針2000*(日本結核病学会抗酸菌検査法委員会編), pp 95-106, 2000
- 8) 樋口武史, 伏脇猛司, 田中奈加子, 他 : Line Probe Assay(LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌群の喀痰からの直接検出. *結核* 79 : 525-530, 2004
(受稿 2005.12.15, 受理 2006.2.28)

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 41 (別刷)

呼吸器 6 結核・非結核性抗酸菌症

我が国における最近の動向, 病態

鈴木克洋

最新医学社

第6章

非結核性抗酸菌症

我が国における最近の動向，病態

要旨

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

基礎知識

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

● キーワード

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

我が国における最近の動向

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

1. 肺 NTM 症の絶対的増加

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

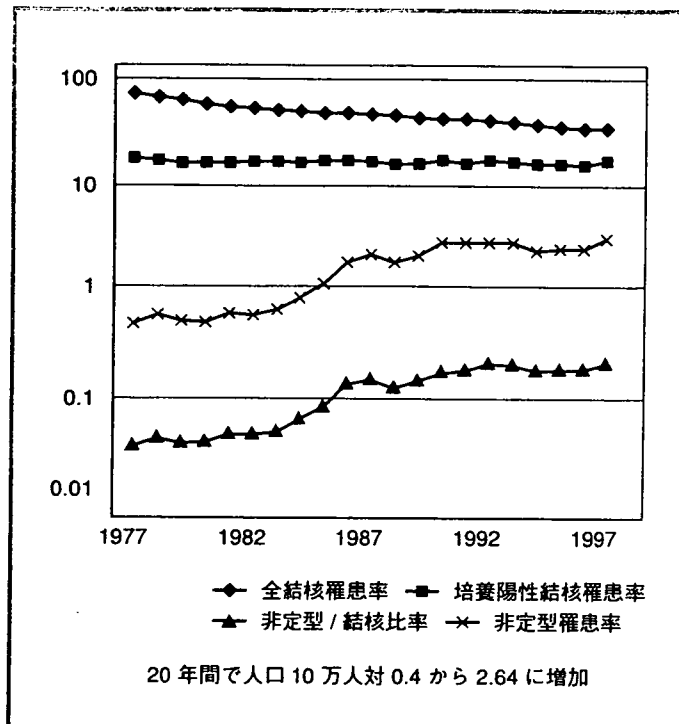
国療共研のデータの推移から我が国における肺 NTM 症の最近の動向を概観してみる。1977 年から 1997 年までのおおよその推移を図 1 に示す。このデータは調査対象施設での肺結核に対する肺 NTM 症の比率を計算し、届け出義務があり全国規模での罹患率が判明している肺結核罹患率との積をとることで、肺 NTM 症の我が国における罹患率を推定したものである。肺 NTM 症の罹患率の推定値は 20 年間で 10 万対 0.4 から 2.64 へと大幅に増加していることが分かる。

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

表 1 我が国で感染症が報告されている非結核性抗酸菌

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

図1 結核と非結核性抗酸菌症罹患率の年次推移



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

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

2. *M. kansasii* 症の全国的な発生を始めとする地域差の縮小

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

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

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

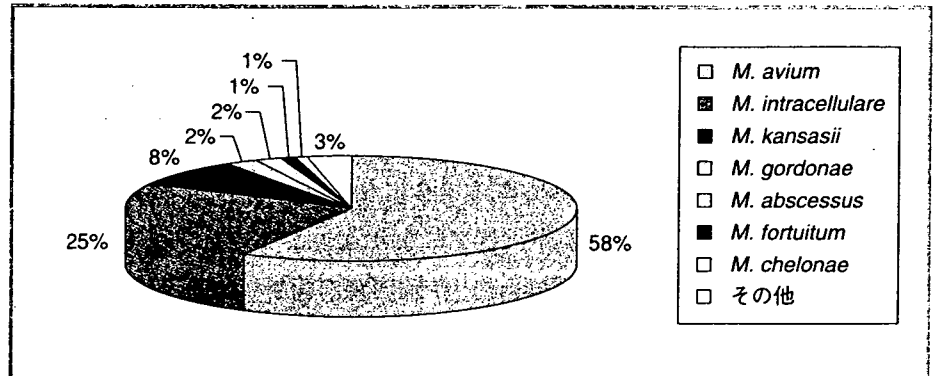
3. 菌種の多様化

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

4. 結節・気管支拡張（中葉・舌区）型の肺 MAC 症の増加

従来肺 MAC 症は陳旧性肺結核・肺気腫などに合併するいわゆる

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



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

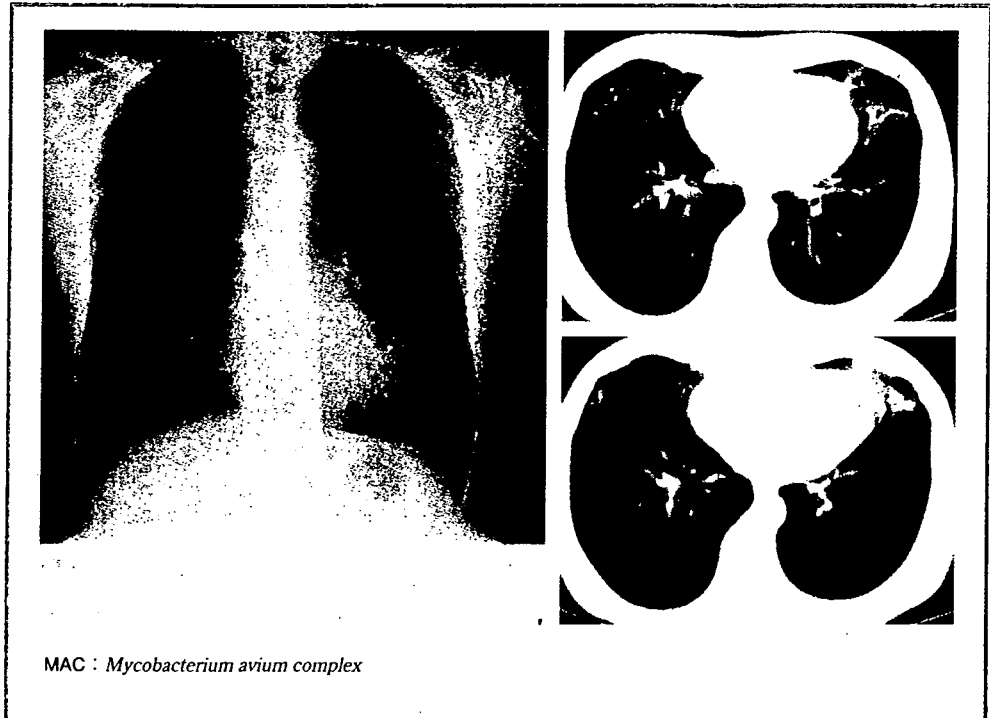
これは以前から Shimoide により，気管支炎型とか中葉・舌区型とか言われていたものに相当すると思われる⁹⁾が，特に胸部CTにより画像所見が詳細に分析され，中葉・舌区を中心とした肺野末梢の小結節と気管支拡張所見を特徴としているため，結節・気管支拡張（中葉・舌区）型と呼ばれるようになった（図3）¹⁰⁾。一方，従来からの肺MAC症は肺結核類似の画像所見をとることが多く，空洞・破壊型と呼ばれている¹⁰⁾。これらの点に関しては次項で詳述されている。

病態

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

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

図3 中葉・舌区型肺 MAC 症 (63 歳女性)



る²⁻⁵⁾。このような患者の画像は中葉・舌区を中心とした気管支拡張像と結節影が特徴で、結節・気管支拡張(中葉・舌区)型と呼ぶことは先に述べた(次項で詳述)。経過は比較的良好で、10～20年の間隔でゆっくりと進行する例が多い。中年以降の基礎疾患のない女性の肺 MAC 症が増加した理由はいろいろと議論されてきたが、現在のところ明確な結論は出ていない。

欧米で有力なのが、中年以降の女性はシャワーや水仕事で NTM を含む飛沫に暴露される機会が多いという説である。近年米国で循環式のジェットバス使用者に MAC を原因とする過敏性肺炎の発生が多数報告され、hot-tub lung と呼ばれている¹³⁾¹⁴⁾。短期間に多量の MAC 菌体を吸入することが、感染症ではなく過敏性肺炎を惹起する理由と推測されるが、肺 MAC 症の成立機序を考えるうえでも興味深い病態である。今後我が国でも結節・気管支拡張型肺 MAC 症患者の生活環境を詳細に検討する必要があるだろう。

中年以降の女性が多い点より、閉経による女性ホルモンの急激な低下が発症に関係していると考えている研究者もいる。我々もマウスの

気道感染モデルを用い、卵巣を除去した群でコントロール群と比べて有意に肺内生菌数が増加することを証明した¹⁵⁾。しかし、閉経前の女性や男性の発症例もあり、実際の臨床での性ホルモンの役割は明確とはなっていない。

中年以降の女性は慎み深く人前で咳や痰を出さないように我慢するため、中葉や舌区に混入した MAC の排出が特に悪くなり発症するという説を 1990 年代にカナダのグループが発表した。ロンドンの社交界の貴婦人をもじって Lady Windermere syndrome と命名したが、その後立ち消えとなった説である¹⁶⁾。

マウスでは MAC 感染の感受性・抵抗性を決定する遺伝子として *Nramp* が発見されている¹⁷⁾。一方、ヒトの相同遺伝子である *NRAMP* は、結核の発病に関連しているとの報告はあるが¹⁸⁾、MAC 発症との関連は証明されていない。肺 MAC 症の発病に関与する遺伝子の検索は重要課題で、現在我が国でも全国レベルでの臨床研究が進行中であり、その結果が待たれるところである。

鈴木克洋

文献

- 1) 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. 結核 78: 569-572, 2003.
- 2) Prince DS, et al: Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 321: 863-868, 1989.
- 3) Swenson SJ, et al: Computed tomographic diagnosis of *Mycobacterium avium*-intracellular complex in patients with bronchiectasis. *Chest* 105: 49-52, 1994.
- 4) Kennedy TP, et al: Nontuberculous mycobacteria. An underappreciated cause of geriatric lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1654-1658, 1994.
- 5) Tanaka E, et al: Yield of computed tomography and bronchoscopy for the diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 2041-2046, 1997.
- 6) 佐藤滋樹, 他: 座談会「肺非結核性抗酸菌症の診断と治療」. 呼吸 24: 106-117, 2005.
- 7) 喜多舒彦, 他: 日本における非定型抗酸菌感染症の研究 (国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 1987 年度および 1988 年度報告). 結核 66: 651-659, 1991.
- 8) Saito H, et al: Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 27: 994-997, 1989.
- 9) Shimoide H: A clinical study on atypical

- mycobacteriosis (report XI): on the middle lobe-lingula type, chronic bronchitis type, brochiectatic type. *Jpn J Chest Dis* 39: 866-878, 1980.
- 10) Iseman MD: Pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex. In: *Mycobacterium avium* complex infection (Korvic J A, et al ed). p45-47. Marcel Dekker, New York, 1996.
 - 11) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 156: S1-S21, 1997.
 - 12) 水谷清二: 特に *M. kansasii* 症について. *化療の領域* 15: 728-732, 1999.
 - 13) Khor A, et al: Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung). *Am J Clin Pathol* 115: 755-762, 2001.
 - 14) Marras T K, et al: Hypersensitivity pneumonitis reaction to *Mycobacterium avium* in household water. *Chest* 127: 664-670, 2005.
 - 15) Tsuyuguchi K, et al: Effect of estrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol* 123: 428-434, 2001.
 - 16) Reich J M, et al: *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingula or middle lobe pattern. *Chest* 101: 1605-1609, 1992.
 - 17) Vidal S M, et al: Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of candidate of BCG. *Cell* 73: 468-485, 1993.
 - 18) Selvaraj P, et al: NRAMP1 gene polymorphism in pulmonary and spinal tuberculosis. *Curr Sci* 82: 451-454, 2002.

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事例について概説し、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癒した後、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。

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, Rüscher-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.