

- resistance to isoniazid in Japan. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2263-2268.
5. 大友幸二, 水野和重, 御手洗聡, 和田雅子 (結核療法研究協議会): 結核療法研究協議会2002年度入院時結核菌薬剤感受性に関する研究: 検査精度の検討 結核 2007. 82. 155-164.
6. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森 健一, 須山尚史, 矢野修一, 川城丈夫, 尾形英雄: 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 (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核 2007; 82: 449-454.
7. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide surveillance in 2002. Int J Tuber Lung Dis 2007; 11: 1129-1135.

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部
細菌検査科
近松絹代
結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部
細菌検査科

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

<研究協力者>

吉山 崇

結核予防会複十字病院診療部付部長

御手洗聡

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部
細

水野和重

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部
細菌検査科

山田博之

資料1 「結核菌の薬剤感受性状況に関する研究」参加協力施設一覧

施設名	施設名
国立病院機構函館病院	済生会明和病院
市立室蘭総合病院	国立病院機構滋賀病院
国立病院機構札幌南病院	京都市立病院呼吸器科
北海道社会保険病院	大阪市立北市民病院
労働福祉事業団岩見沢労災病院	(財)結核予防会大阪病院
国立病院機構道北病院	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
青森県立中央病院	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
岩手県立中央病院	西神戸医療センター
国立病院機構盛岡病院	国立病院機構奈良医療センター
東北厚生年金病院	神田病院
埼玉県立循環器・呼吸器病センター	国立病院機構和歌山病院
国立病院機構茨城東病院	国立病院機構松江病院
国立病院機構宇都宮病院	(財)岡山県健康づくり財団附属病院
国立病院機構西群馬病院	川崎医大川崎病院
埼玉県立循環器・呼吸器病センター	川崎医科大学附属病院
国保直営総合病院君津中央病院	国立病院機構南岡山医療センター
東京都立府中病院	国立病院機構東広島医療センター
国立病院機構東京病院	国立病院機構山陽病院
(財)結核予防会複十字病院	国立病院機構東徳島病院
東京都立清瀬小児病院	国立病院機構愛媛病院
川崎社会保険病院	国立病院機構高知病院
川崎市立井田病院	国立病院機構福岡東医療センター
国立病院機構南横浜病院	九州大学胸部疾患研究施設
国立病院機構神奈川病院	国立病院機構大牟田病院
国立病院機構富山病院	国立病院機構東佐賀病院
金沢市立病院	長崎市立病院成人病センター
県立須坂病院	国立病院機構長崎神経医療センター
国立病院機構中信松本病院	国立病院機構熊本南病院
総合病院聖隷三方原病院呼吸器センター	国立病院機構西別府病院
国立病院機構天竜病院	国立病院機構南九州病院
国立病院機構東名古屋病院	国立病院機構沖縄病院
国立病院機構三重中央医療センター	
総計 (63 施設)	

資料2 2005年の結核菌陽性患者数に基づく必要予測数と現状(2008年2月28日現在)

ブロック	罹患数	比率	予定数	収集予定数(+10%)	収集菌株数	充足率
北海道・東北	856	0.08	214	235	234	1.09
関東	3,937	0.35	984	1,082	1,383	1.41
中部・北陸	1,666	0.15	416	458	374	0.90
近畿	2,745	0.24	686	754	737	1.07
中国・四国	901	0.08	225	248	377	1.68
九州	1,213	0.11	303	333	542	1.79
計	11,318	1.00	2,828	3,110	3,647	1.29

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
結核菌に関する研究

反復配列多型（VNTR）分析を利用した国内結核菌の型別

研究分担者：

前田 伸司 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科 科長

研究要旨

我々は、日本国内の結核菌分析のための反復配列多型（VNTR）分析システム（JATA[12]-VNTR）を構築して既に報告している。本分析システムを実際の事例に応用したところ、集団感染疑い例において関連する株同士の型別に利用できることが確認できた。しかし、地域内で発生した結核菌の分子疫学解析に本分析法を適用すると、JATA(12)-VNTRのクラスター形成率は、IS6110 制限酵素断片長多型（RFLP）分析より10%以上高く、識別能が低いことが判明した。そこで、JATA(12)にいくつかのローサイを加えた改良を行いIS6110 RFLP 分析法と同程度の識別能を持つ VNTR システム構築を行った。JATA(12)に ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982（3 箇所追加）、ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR3820 あるいは ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR4120（4 箇所追加）の組合せで IS6110 RFLP 分析と分解能がほぼ同じになることが判明した。この組合せは東京都内で分離された結核菌を使った分析から導き出したが、沖縄県で分離した結核菌を使った分析でも同様な結果が得られた。

A. 研究の目的

現在、結核菌型別の標準分析法である IS6110 をプローブとした制限酵素断片長多型分析（RFLP）法は、20g 以上の高分子ゲノム DNA が必要なため菌培養、さらに分析に3-4日必要である。そのため、生きた菌を分析施設に送ること、また菌を扱うための P3 実験室等の施設が必要なため、分析には高い障壁が存在する。一方、ゲノムプロジェクトから判明した結核菌が持つミニサテライト DNA を利用して型別を行う反復配列多型（VNTR）分析法

が、新しい型別法として報告された。VNTR 分析は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を利用するため培養や DNA を精製する必要がなく臨床検体から2日以内で結果が得られる。分析システムとして、米国では Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-VNTR が、ヨーロッパで諸国では Supply らの 15-locus VNTR が標準型別法として採用されている。日本国内では、北京型結核菌が7-8割を占めており、これら VNTR システムの型別能力は高くないことが報告されている。そ

ここで、日本全国の株を分析し、国内株を効率よく型別できる JATA(12)-VNTR システムを構築した。集団発生疑い事例ではこの分析システムで十分判別可能であったが、人口ベースの地域内での分子疫学調査では、IS6110 RFLP 分析のクラスター率より高いことが判明した。そこで、識別能を上げるために JATA(12)-VNTR システムの改良を行った。

B. 方法

分析に用いた結核菌：平成 16 年 6 月から平成 17 年 11 月までの間に東京都内で分離された結核菌 146 株、および平成 17 年 1 月から平成 19 年 9 月までに沖縄県内で分離された結核菌 216 株を用いて型別分析を行った。

結核菌の型別：IS6110 RFLP 分析、Supply(15)-VNTR、JATA(12)-VNTR および JATA(12)プラスアルファのローサイについて識別能力の違いを比較した。

識別能力の比較：Supply(15)-VNTR、JATA(12)-VNTR 等の識別能力の比較は、代表的な指標のひとつであるクラスター形成率を用いた。

C. 結果

東京都内で分離された 146 株の結核菌を用いて、IS6110 RFLP、Supply(15)-VNTR および JATA(12)-VNTR のクラスター形成率を比較した(表 1)。RFLP 分析でのク

ラスター形成率は、34.7%であるのに対して、JATA(12)-VNTR 分析では 46.9%であり、15 箇所を分析する Supply(15)-VNTR (48.3%) よりは低いが、RFLP 分析に比べて 10%以上もクラスター形成率が高かった。このようにクラスター形成率が高いという結果は、地域内で発生した結核菌の分子疫学調査に JATA(12)-VNTR 分析を導入した場合、本来無関係な株同士が同じプロファイルになる可能性が高くなり集団感染が疑われる事例が多くなる。そのため、分析結果の解釈が難しくなると考えられる。そこで、地域内での分子疫学調査に VNTR 分析法を利用するためには、JATA(12)-VNTR 法の改良を行う必要がある。

表 1. 東京都内で分離した結核菌 (146 株) を用いた型別法の比較

型別法	クラスター形成率 (%)
IS6110 RFLP	34.7
VNTR	
Supply(15)	48.3
JATA(12)	46.9

いくつかのローサイを JATA(12)に加えると識別能を上げることができる。JATA(12)は、北京型結核菌を型別できる可能性が高い 35 箇所を VNTR 分析して、*h* 値が高いローサイを上から 12 箇所選択したものなので、単純に 13-16 番目の 4 か所のローサイを加えてクラスター率を算出すると、42.5%となった。この結果から、多くの *h* 値が低い下位のローサイを加

えてもクラスター形成率を大きく低下させることが出来ないことがわかった。

我々が行っている別の結核菌の遺伝的背景に関する研究から北京型結核菌では、ETR-Aのコピー数は、3か4、VNTR1982では8か10の場合が多いことが判明している。これらのローサイは安定で変化し難いが、それぞれ北京型結核菌を大きく2つに区分することができる。また、高頻度変化部位(Hyper variable)に関しては、コピー数が大きい株が高頻度で含まれていることが大きな問題である。つまり、分析の際に得られるPCR産物が高分子となりアガロースゲルを用いた電気泳動ではコピー数の違いを判別することが難しい。そのため、これら4箇所の高頻度変化部位のローサイはJATA(12)-VNTR分析法を構築する際に除いた。しかし、高頻度変化部位領域を加えなければ満足できる程度までクラスター形成率を低下させることができない。そのため、1-2箇所の高頻度変化部位領域を含むようなJATA(12)-VNTRシステムの改良を行った。

東京株146株を用いて多くの組み合わせを検討して、クラスター形成率を比較すると、JATA(12) + ETR-A + VNTR2163a (下線はHVローカス) (14箇所) で37.7%、JATA(12)+ETR-A+VNTR2163a+VNTR1982 (15箇所) で36.3%、JATA(12) + ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR3820 (16箇所) で33.6%、JATA(12)+ETR-A

+ VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR4120 (16箇所) で29.5%となり、IS6110 RFLPと同程度のクラスター率(34.7%)となる組み合わせは、JATA(12) + ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 の15箇所またはJATA(12) + ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR3820 or VNTR 4120 だった。

次に沖縄県内で分離された結核菌216株を使って解析を行うと東京都内で分離した結核菌の解析結果と同様な傾向だった。つまり、クラスター形成率の数字は異なるが、それぞれの組み合わせにおけるクラスター形成率の大きさの順番は同じだった。

D. 考察

VNTR法は、IS6110 RFLP分析に代わる結核菌の型別法として提唱されている。しかし、各国で広まっている結核菌の遺伝的背景は異なることがわかってきており、識別能が高いVNTR分析システムは国により異なるものと考えられている。我々は、全国から集めた結核菌を使って日本国内では、JATA(12)-VNTRシステムが識別能も高く、最も効率よく結核菌を型別できることを報告している。集団感染や院内感染疑い例における型別事例において、このJATA(12)-VNTRシステムは利用できるが、地域内で発生した結核菌の全数分析にJATA(12)-VNTR分析システムを直接適応できないため改良システムを検討した。人口密集地である

東京都内で分離した株を使って作成した改良法であるが、沖縄県から分離した株を使った分析でも同様な結果が得られている。そのため、本改良法は、大都市だけではなく地方を含めた日本全国で利用できることが期待される。今後、他の都市（例えば、大阪市や神戸市）で分離された株で分析を行い本法が人口ベースの疫学調査に利用できることを確認し、本改良法を日本全国に広めていく予定である。

一方、高頻度変化部位と安定なローサイの割合や分析ローカス数など、追加ローサイの選択は非常に難しかった。安定な（変化に乏しい）ローサイである ETR-A や VNTR1982 を加えて分析してもクラスター率の変化（低下）は、観察できなかつた。しかし、多くの株から構成されるクラスターを複数のクラスターへと細分化することがわかつた。つまり、例えば、7 株からなるクラスターを 3 株と 4 株からなるグループ（クラスター）へと分割することができる。このように、クラスター形成率を指標とした型別能の評価では重要ではないが、結核菌の型別のためには必要なローサイであると考えられる。

E. 結論

人口ベースの分子疫学調査に JATA(12)-VNTR を導入した場合、識別能が低く（クラスター形成率が高い）無関係な株を同一株と判定してしまう可能性が高いことが判明したため

JATA(12)-VNTR システムの改良を行った。JATA(12) + ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 の 15 箇所または JATA(12) + ETR-A + VNTR2163a + VNTR1982 + VNTR3820 or VNTR4120 の 16 箇所の分析で IS6110 RFLP 分析とほぼ同程度のクラスター形成率が得られた。この改良 JATA システムは、人口ベースの疫学調査に利用することができると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, Maeda S: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol., 57: 873-880, 2008
- (2) Wada T, Iwamoto T, Maeda S: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in EastAsia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett., 291: 35-43, 2009
- (3) 前田伸司、村瀬良朗、御手洗聡、菅原勇、加藤誠也：国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型（VNTR）分析システム - JATA (12) -VNTR 分析法の実際 - 結核. 83: 673-678, 2008

- (4) 前田伸司、村瀬良朗：第80回総会シンポジウム、IV. 分子疫学研究の進歩と対策への応用. 共通化した反復配列多型 (VNTR) 分析法による結核菌の型別. 結核. 84, 53-55, 2009

2. 学会発表

- (1) 前田伸司、村瀬良朗：学会シンポジウム：共通化した反復配列多型 (VNTR) 分析法による結核菌の型別. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008
- (2) 村瀬良朗、大角晃弘、内村和広、前田伸司：12VNTR(JATA)を用いた同一感染源疑い事例の解析. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008
- (3) 斎藤肇、岩本朋忠、中永和枝、松本英伸、早川啓史、鹿住祐子、前田伸司、長野誠：肺疾患患者より分離された新抗酸菌（続）新たに分離された6菌種の細菌学的性状. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008
- (4) 鹿住祐子、宇田川忠、前田伸司、菅原勇、長野誠：先天性 IL-12 受容体欠損症患者から長期にわたって分離された *Mycobacterium porcinum* の細菌学的検査. 第83回日本結核病学会総会、東京、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核菌に関する研究

薬剤耐性の診断技術の開発

研究分担者：

切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

研究要旨

結核菌の薬剤感受性試験は数週間から数ヶ月間を要し、これに代わる迅速診断法の開発と臨床応用が急務となっている。昨年度までにピラジナミド耐性遺伝子ラインプローブ法を試作し、評価試験を進めてきた。本年度は、第一に抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法を開発し、評価試験を開始した。第二にイソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発に着手した。前者は抗酸菌種 (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*) の同定および薬剤耐性 (リファンピシン, イソニアジド) を同時に検出できるキットであり、臨床検体150例、臨床分離株600株を対象にした臨床試験を開始した。後者に関しては、検出率を向上させるために独自の解析領域を設定して変異情報を蓄積し、ラインプローブを試作した。

A. 研究目的

結核症の治療において、抗酸菌種と薬剤感受性を同定することは重要である。しかし、菌種の鑑別と薬剤感受性試験には数週間から数ヶ月間を要し、これに代わる迅速診断法の開発と臨床応用が急務になっている。

本研究の目的は、抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発と評価試験の実施ならびにイソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発である。前者は、*rpoB* 遺伝子の特定領域を利用した抗酸菌種の同定と抗結核薬の中でも特に頻用される強力な二剤 (リファンピシン, イソニアジド) に関わる耐性遺伝子内変異の同定を同時に実施できるものである。後者は、イソニアジド耐性をより高精度に検出できるものである。

B. 研究方法

【B-1. 抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発と評価試験】
抗酸菌種の同定には、*rpoB* 遺伝子内にみられる抗酸菌種間可変領域を利用した。リファンピシン耐性検出には、*rpoB* 遺伝子内変異の中でも特に検出率の高い4変異を選択した。イソニアジド耐性検出には、*inhA* 遺伝子のプロモーター領域内変異と *katG* 遺伝子内変異の中でも特に検出率の高い14変異を選択した。選択した配列をラインプローブとしてストリップ上に固定し、キット化した。臨床検体150例、臨床分離株600株を対象にした臨床試験を開始した。

【B-2. イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発】
イソニアジド耐性検出率を上げるため、既知イソニアジド耐性遺伝子・耐性領域 (図

1・青色)に加え、独自の解析領域(図1・赤色)を設定した。臨床分離株における変異を同定した。

解析領域の設定:イソニアジド耐性遺伝子に関わる論文を精査し、*furA-katG* オペロンとそのプロモーター領域、*fabG1-inhA* オペロンとそのプロモーター領域、*ndh* とそのプロモーター領域、*ahpC* とそのプロモーター領域、計4領域・7,157bpを解析対象に設定した(図1)。

菌株の収集:国立国際医療センター、国立病院機構東京病院から、臨床分離株159株を収集した。

ゲノムDNAの抽出:ゲノムDNAの抽出は、Ausubelらの方法(Current protocols in molecular biology, 1998)に従った。

解析領域の増幅:領域の両端に特異的に結合するプライマーを設計し、PCRによって増幅した。

塩基配列の決定:増幅したDNAフラグメントからプライマーを除去し、4領域の全塩基配列を決定するために18種類のプライマーを設計した。サイクルシーケンシング反応からダイターミネーター法による塩基配列の決定に至るまでの作業はアプライドバイオシステムズ社の推奨方法に従った。

塩基配列の解析:塩基配列の解析及び編集は、ジェネティクスソフトウェアを用いて行った。*M. tuberculosis* H37Rv株の塩基配列をリファレンスとし、変異の有無を調べた。

ラインプローブ作製:同定した変異情報の一部を利用してラインプローブを試作した。

【倫理面への配慮】

研究対象は、患者情報と完全に切り離さ

れた臨床分離株である。

C. 研究結果

【C-1. 抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発と評価試験】

キットを作製した(図2)。一枚のストリップ上で抗酸菌種(*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*)の同定および薬剤耐性(リファンピシン、イソニアジド)を同時に検出できる。

臨床検体150例、臨床分離株600株を対象にした臨床試験を開始した。平成21年12月末日までに完了予定である。

【C-2. イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発】

ラインプローブ作製のために独自の解析領域を設定し、変異情報の蓄積を推進した。

平成21年3月17日現在、159株の臨床分離株について、解析対象の全塩基配列を決定し、変異の有無を確認した。159株の内訳は、イソニアジド耐性株108、イソニアジド感受性株51である。108株のイソニアジド耐性菌のうち、既知変異を持っていたものは69株(64%)だった。本研究では新規変異を22種類見出した。新規変異だけを持つイソニアジド耐性菌は35株(33%)だった。また、新規変異の中で特に出現頻度の高いものが2種類あり、それぞれ18株(17%)、20株(19%)で見出された。既知変異あるいは新規変異を持つ耐性菌は104株(97%)だった(図3)。同定した変異情報の一部を利用してラインプローブを試作した(図4)。

D. 考察

菌株の分離・培養を経た抗酸菌種の同定や薬剤感受性試験は一般的で確立された方法である。しかし、結果が判明するためには数週間から数ヶ月間を要し、治療の律速因子でもある。一方で、検体もしくは臨床分離株からゲノム DNA を抽出し、特定の領域内の変異の有無によって、抗酸菌種や薬剤耐性化を判断することは、既報論文などからも迅速で精度の高い方法である。特にリファンピシン耐性に対する *rpoB* 変異やピラジナミド耐性に対する *pncA* 変異は、限定された一遺伝子内変異に耐性化の大部分が起因するため、非常に有用である。しかし、この方法を実施するには、高価なシーケンサーと試薬が必要であり、検査室への導入が難しい。本研究では、これらの問題点を克服するために PCR による増幅とラインプローブ法を組み合わせ、より安価でより迅速な遺伝子診断法を開発した。

【D-1. 抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発と評価試験】

抗酸菌種 (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*) の同定および薬剤耐性 (リファンピシン, イソニアジド) を同時に検出できるキットを開発した。現在、臨床検体 150 例、臨床分離株 600 株を対象にした臨床試験を実施中である。平成 21 年 12 月末日までに試験完了予定であり、本キットに対する評価を下す。

【D-2. イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発】

これまで、イソニアジド耐性に関わる変異は *katG*, *inhA*, *inhA* のプロモーター領域における変異に起因するとされ、多くの既

報論文ではこれら領域内だけを対象としている。しかし、この領域内に変異を持つイソニアジド耐性株は 60%程度であり、未知の耐性遺伝子・領域の存在が示唆されてきた。本研究ではラインプローブによるイソニアジド耐性の高精度検出を目標とし、独自の解析領域を設定し、新規変異の有無を蓄積した。結果として、これまでに 108 のイソニアジド耐性菌の解析を終え、22 種類の新規変異を見出した。既知変異あるいは新規変異を持つイソニアジド耐性菌は 97% に達した。この結果が単純に検出率の向上に繋がるとは考えていない。新規変異と既知変異の一部に対する機能解析を進めることで評価していきたい。また、新規変異の中で特に出現頻度の高いものが 2 種類あり、それぞれ 17%、19% のイソニアジド耐性菌が変異を保有していた。これら変異のどちらか一方を持つ株は 30% にも達し、イソニアジド耐性に関わる新たなマーカーになる可能性が示唆された。

今後は、本研究で見出された新規変異、新規遺伝子・領域の機能解析を実施し、ラインプローブ作製を推進していく予定である。

E. 結論

抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ法を開発し、評価試験を開始した。イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発に着手し、独自の解析領域を設定して、変異情報を蓄積した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

安藤弘樹, 末竹寿紀, 桑原朋子, 岩田智文,
切替照雄: 結核菌における新規イソニアジ
ド耐性変異の同定と機能解析ならびにラ
インプローブ法を用いた迅速遺伝子診断
法の開発, 第 37 回薬剤耐性菌研究会, 2008
年 9 月 12 日, 渋川.

安藤弘樹, 末竹寿紀, 切替照雄: 結核菌に
おける新規イソニアジド耐性変異の同定と
機能解析ならびにラインプローブ法を用い
た迅速遺伝子診断法の開発, 第31回日本分
子生物学会年会・第81回日本生化学会大
会・合同大会, 2008年12月9日-12日, 神戸ポ
ートアイランド

安藤弘樹, 末竹寿紀, 切替照雄: 結核菌に
おける新規イソニアジド耐性遺伝子の同
定と機能解析ならびに迅速遺伝子診断法
の開発, 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年
3 月 12-14 日, 名古屋国際会議場

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

結核菌におけるイソニアジド感受性を検出
するための方法および試験片(*furA* 主体)

特許出願人: 国立国際医療センター総長,
ニプロ株式会社 佐野實

発明者: 切替照雄, 安藤弘樹, 末竹寿紀, 中
村友彦

出願番号: 特願2008-173477

出願日: 2008年7月2日

結核菌におけるイソニアジド感受性を検出
するための方法および試験片(*fabG1* 主体)

特許出願人: 国立国際医療センター総長,

ニプロ株式会社 佐野實

発明者: 切替照雄, 安藤弘樹, 末竹寿紀,
中村友彦

出願番号: 特願2008-173478

出願日: 2008年7月2日

2. 実用新案登録、その他

なし

図 3：解析結果。

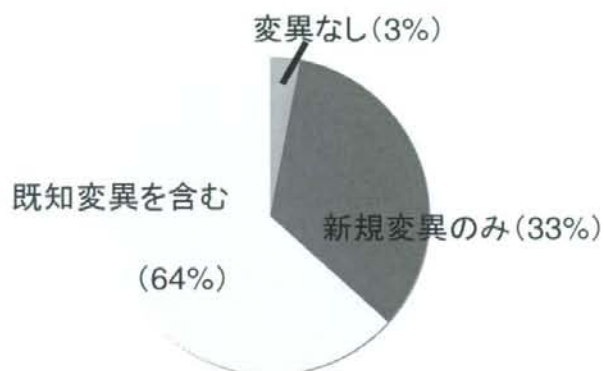
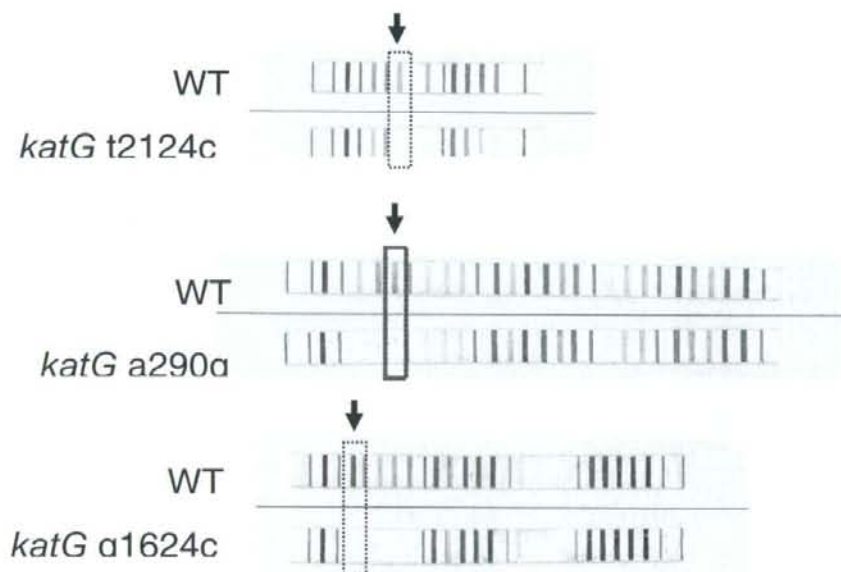


図 4：イソニアジド耐性菌迅速検出ラインブローブ試作版。変異があるとラインブローブに結合できず、発色しない（ラインは消えたまま）。



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
結核菌に関する研究

抗酸菌検査の精度管理と定点監視体制の確立

研究分担者：

御手洗 聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科

研究要旨

結核菌の薬剤耐性サーベイランスシステム確立を目指して、病院検査室から得られる結核菌耐性情報の定点観測による調査法を評価し、併せて抗酸菌検査の精度保証法の確立に関する研究を行った。

抗酸菌検査精度外部保証として、薬剤感受性検査のパネルテストを実施した。2008年度は、今回初めてとなる地方衛生研究所の参加を含めて、計89施設（検査センター24施設、病院検査室59施設、地方衛生研究所6施設）の抗酸菌検査施設を対象とした。2009年3月時点で結果を得た84施設（94.4%）について、Isoniazid、Rifampicin、Streptomycin及びEthambutolでの平均一致率はそれぞれ99.6%、99.5%、94.6%及び94.2%であった。2007年度までに確立した検体数（10検体）及び合格基準（全薬剤に関して一致率90%以上）を適用したところ、84施設中64施設（76.2%）がこの基準を満たしていた。精度改善活動に関するアンケートでは、外部精度評価の結果が菌液調製、内部精度管理、検査法の改善・変更、あるいは結果判定法の改善等に利用されていることが明らかとなった。

全国を7ブロックに分け、薬剤感受性検査外部精度評価により精度を保證された計45施設に対して耐性結核菌に関するアンケート調査を実施し、最終的に23施設（回収率51.1%）から回答を得た。この結果を結核療法研究協議会（療研）による全国調査データ2002年度と2007年度（暫定中間報告）と比較したところ、療研2002年データとの比較では全ての薬剤で有意差がなかった。2007年療研調査との比較では、主要4剤の耐性率が定点観測データで高く、INHとEB及びMDRの耐性率について統計的有意差があった。しかし、定点観測対象とした病院施設が主要な結核診療施設であったため、耐性結核患者が集約している可能性があり、一方療研調査では三種病原体である多剤耐性結核菌の輸送が困難であることから、耐性を過小評価している可能性がある。定点観測をサーベイランス情報として信頼性のあるものにするためには、地域的代表性を確保した上での強制力のある調査が必要と思われる。

A. 研究目的

抗酸菌検査は結核診断のゴールドスタンダードであり、治療法の選択や治療効果の評価に用いられ、臨床的・社会的な重要性が高い。特に薬剤感受性検査の精度維持は、治療成功や耐性菌発生の防止

の意味でも重要である。

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会では2002年より毎年薬剤感受性検査の外部精度評価を実施しているが、評価結果を通じて検査精度の問題点を発見し、維持改善に有用であることが示されてい

る。今回引き続いて2008年の薬剤感受性検査外部精度評価を実施し、精度の維持改善に寄与することを目的とする。

さらに、2007年度から結核療法研究協議会（療研）による薬剤耐性全国サーベイランスが実施されているが、2007年4月1日からの感染症法の改正（病原体等の管理規則は6月1日から）に伴って結核菌の輸送・管理が厳密化されており、特に多剤耐性結核菌が保管されずに滅菌されていたり、輸送の手間がかかるため分与されなかったりすることがおこっている。これは病原体の定期全数調査である療研調査の精度に直接の影響を与えるため、先の薬剤感受性検査外部精度評価の結果を元にした薬剤耐性状況の定点観測に関係した情報の収集を2007年度中に実施した。今回このデータを療研等のデータと比較検討することも目的のひとつとした。

B. 研究方法

1. 抗結核薬薬剤感受性検査外部精度評価

【目的】

パネルテストにより、結核菌の薬剤感受性検査精度を評価する。

【参加要件】

結核菌薬剤感受性検査を実施している病院検査室あるいは検査センター全てを対象とする。基本的には参加は任意であり、「日本結核病学会理事長」および「抗

酸菌検査法検討委員会委員長」名による本調査への参加依頼を実施プロトコールとともに送付し、諾とした施設のみに試験用の検体を送付する。尚、検体の送付やデータの取りまとめ・解析は結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科・御手洗聡が行う。

【送付する検体（結核菌株）】

結核菌10株を小川培地上に発育した状態で送付する。送付する菌株はSupra-national Reference Laboratory Network (SRLN) で毎年実施されている薬剤感受性検査外部精度保証プログラムに使用された菌株を用いる。これらの株については、既にSRLNにて評価が定まっており、その最終的な評価を基準として感受性・耐性を判定する。それぞれの施設に配付される検体には、一検体ずつ異なる番号が割り振られており、全ての結果はこの番号によって分類される。送付する菌株の中には薬剤耐性株が含まれているが、感染症法の改正に伴って多剤耐性結核菌の運搬の条件が厳格になったため、多剤耐性結核菌を使用しない。しかしながら、他の耐性は存在するため、取り扱いには十分なる注意を要する。なお、被験菌は国連容器を用いて三重包装とし、ゆうパックにて郵送する。

【試験薬剤】

検査薬剤は、結果の安定性を考慮してIsoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM)およびEthambutol (EB)

とする。尚、INH については基準濃度の結果のみでよいこととする。

【感受性検査方法】

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性検査を行う。調査用紙に感受性検査に関するいくつかの事項（菌液調製法、検査法等）を記入し、検査結果とともに報告する。

【結果の返送】

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

【結果の評価】

それぞれの菌株の薬剤感受性検査の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定する。最小発育阻止濃度（MIC）を用いて測定する場合は、各施設にて感受性・耐性の基準を定める事とする。尚、報告用紙に記入する際は、感受性には S、耐性には R を用いて表記する（MIC にて I とする場合は R か S かのどちらか各施設にて判定する）。また、複数の方法について評価を希望する場合は、それぞれの結果を別々の用紙に記載する。

【結果の解析】

データについては「感度」、「特異度」、「耐性的中率」、「感受性的中率」および「一致率」を計算し評価する。ここで感度とは、SRLN で耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様に SRLN で感受性とした株を正

しく感受性と判定する割合である。耐性的中率とはある菌株を「耐性」と判定した時、その判定が正解である確率であり、同様に感受性的中率とはある菌株を「感受性」とした時の正解率である。一致率は SRLN との判定の一致の割合を示す。

解析結果については個々の解析が終了した時点で各施設に個別に通知する。

【試供検体の処理】

試供検体については、各施設にて検査終了後廃棄する。

【参加証の交付】

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会名にて、薬剤感受性検査外部精度評価パネルテストに参加したことを認める証明書を発行する。尚、参加証の発行は結果の報告を受けた時点で行うものとする。

【その他】

検査の安全性に配慮し、感染症法の定める結核菌取扱基準を満たしている施設のみ参加可能とする。

【精度評価結果に基づく改善活動に関するアンケート調査】

外部精度評価を実施した検査施設に対して、精度改善活動を実施したか否かを問うアンケートを実施した。アンケート項目は以下の通りである。

1. 施設名
2. 回答者
3. 菌液調製に関する変更点（分散方法、濁度確認方法等）
4. 菌株の保存に関する変更点（保存用

培地、保存温度等)

5. 内部精度管理に関する変更点 (標準株使用、実施頻度等)
6. 検査方法に関する変更点 (検査キット、方法等)
7. 培養方法の変更点 (培養方法、培養期間、CO₂ インキュベータ使用等)
8. 結果判定に関する変更点 (判定時期、判定基準等)
9. 今回のパネルテスト実施上の考えられる不具合

上記項目について、自由記載方式で回答を得た。

2. 薬剤耐性状況定点観測

【目的】

日本では耐性結核菌サーベイランスシステムが存在しないため、適時的な耐性情報管理・提供が困難である。そこで、日本国内で結核患者の診療を行っている主な病院施設を対象として、定点観測的に耐性結核菌情報を集約することを検討する。個々の病院における結核菌の耐性状況を地域ごとにまとめることにより、最終的に日本全体を代表するサーベイランス情報とすることが可能かどうか検証することを目的とする。

【方法】

日本の耐性結核サーベイとしては、結核療法研究協議会 (療研) による調査が代表的であり、2002 年度の調査でもその精度が示されている。病院施設の耐性状

況を定点観測する場合、サンプリングする施設数が少ないため、それらを統合した情報が真に全国を代表するか否かを検討する必要がある。療研では 2007 年 8 月から 13 回目の全国調査を開始しており、そこから得られるデータと定点観測データの違いがないかどうかを比較することで、定点観測データの精度を評価する。

日本全体を 7 ブロック (北海道、東北、関東、中部北陸、近畿、中国四国、九州) に分けて、それぞれ主要な結核診療施設 4~6 施設を対象とする。集計はブロックごとにまとめることとし、個々の施設については特定しない。施設名も公表しない。2007 年度の療研データがまとまった時点で、相互にデータの比較を行う。

データの対象は、療研調査との整合性を考慮して、基本的に 2007 年 8 月 1 日以降からの現在までに確定している感受性結果とする。個々の施設での集計システムの違いを考慮して、前後 3 ヶ月程度の対象期間のずれは許容する。

C. 研究結果

【抗結核薬感受性検査外部精度評価】

2008 年度は、結核病学会のインターネットホームページ、結核病学会雑誌にて外部精度評価パネルテストへの参加を呼びかけた。結果として、計 89 施設 (検査センター 24 施設、病院検査室 59 施設、地方衛生研究所 6 施設) の参加を得た。平成 21 年 3 月 11 日現在で 5 施設が未回答

である。(回収率 94.4%)

表 1 2008 年度薬剤感受性検査パネルテスト構成

Strain ID	INH	RFP	SM	EB
IV-30	R	S	S	S
VII-4268	R	S	R	S
IX-3775	R	S	S	R
IX-5328	S	S	R	R
IX-7406	R	S	R	R
XI-44	S	R	S	S
XI-119	S	R	S	S
XI-148	S	R	S	S
XI-1451	S	R	R	S
XI-1859	R	S	R	R

R: Resistant S: Susceptible

今回は耐性既知の 10 株の結核菌を各施設に配布した。結核菌パネルの構成と感受性パターン (標準判定) は表 1 の通りである。89 施設に対して、全部で結核菌 890 株を送付したが、送付先で発育しなかった株が 1 株 (0.1%) 認められた。

各施設での検査法は、比率法を採用しているのが 76 施設 (90.5%)、MIC を採用しているのが 8 施設 (9.5%) であり、それ以外の方法を採用している施設はなかった。具体的には、ピットスペクトル SR が 35 施設 (41.7%)、ウエルバック S が 26 施設 (31.0%)、BACTEC MGIT 960 による MGIT AST が 12 施設 (14.3%)、プロスミック MTB-I が 8 施設 (9.5%)、1%小

川培地が 3 施設 (3.6%) で実施されていた。3 施設で複数の方法を用いていたが、これらはプロスミック MTB-I と 1%小川培地の組み合わせが 1 施設、プロスミック MTB-I とウエルバック S が 1 施設、MGIT AST とウエルバック S が 1 施設であった。これらの施設については、精度評価は両方の検査法について行ったが、統計的な解析には使用頻度の高い方の結果を使用した。

各施設から送られた薬剤感受性検査を、標準結果と比較して解析した。表 2 は被験菌株・薬剤ごとの判定一致施設数を比率で示したものである。INH、RFP、EB については全ての菌株で 80%以上の一致率を示したが、IX-5328 株について SM での一致率が 48.8%であり、80%を下回った。

表 3 参加施設全体の精度を薬剤別に示し、表 4 に薬剤別・検査方法別の結果を示した。

今回のパネルテストでは、Supra-national Reference Laboratory Network (SRLN) で毎年実施されている薬剤感受性検査外部精度保証プログラムに使用され、少なくとも 80%以上の一致が得られた菌株を使用した。IX-5328 株について SM での一致率が 48.8%であり、80%を下回った。方法的な偏りはないと思われるため、現時点で明確な基準を設けていないものの、この株については評価の対象外と考えてもよいと思われた。

また、全ての薬剤について一致率が90%以上であった施設の数64施設(76.2%)であった。

表5に施設別の精度評価結果を示した。今回初めて地方衛生研究所にも検体を送付し、パネルテストを実施した。EBに関する一致率が90%を下回る施設が病院検査室で22.8%、検査センターで13.0%認められたが、地方衛生研究所では90%未満の施設は認められなかった。

今回外部精度評価に参加した施設について、結果に基づいた精度改善が行われたかどうかをアンケート調査したところ、現在までに23施設(27.4%; 23/84)から回答があった。

今回回答があった施設の各薬剤に対する平均精度(一致率)はINHで98.7%、RFPで99.6%、SMで97.0%、EBで94.8%であり、基本的に精度の良い施設からの回答が殆どであった。

結果として殆ど改善点はないという回答が多かったものの、5施設で検体(菌液)調製法の改善を実施(予定を含む)し、3施設で内部精度管理が開始されていた。また7施設が新たな検査法への変更を行うと回答し、1施設で結果判定時期を変更していた。

【薬剤耐性状況定点観測】

全国を7ブロックに分け、計45施設(北海道5施設、東北4施設、関東8施設、中部北陸7施設、近畿6施設、中国四国6

施設、九州8施設)に対して耐性結核菌に関するアンケート調査を実施した。最終的に23施設(回収率51.1%)から回答を得た。12施設については未治療と既治療耐性を分けて集計していたが、その他の12施設については既治療・未治療を分類せず「Combined」として集計していた(表6・添付資料)。

これを結核療法研究協議会による全国調査データ2002年度と2007年度(暫定中間報告)と比較した結果を資料表7に示した。療研2002年データとの比較では全ての薬剤で有意差がなかった。2007年療研調査との比較では、主要4剤の耐性率が定点観測データで高く、INHとEB及びMDRの耐性率について統計的有意差があった。またRFPについても有意差はないものの、大きな差が認められた。また療研データ相互の比較では、SMを除いて有意な耐性率の差が認められた。

D. 考察

【薬剤感受性検査の外部精度評価】

今回のパネルテストにおいても、INHとRFPの感度・特異度は平均95%を超えており、また一致率も全ての薬剤で平均90%を超えていた。総合的には十分な精度と考えられたが、やはりいくつかの施設で精度が不十分な場合があり、パネルテストの結果による改善活動が行われることが期待された。

パネルテストによる外部精度評価の結