

整備法が制定されたのに伴い、感染症予防法第30条第2項第4文の改正が行われた。これによって、法形式的な位置付け及び法的技術的な文言の変更等は見られるものの、法的な大枠ないし法的手続の大きな流れ自体には、実質的な意味での大きな変更は施されなかった。

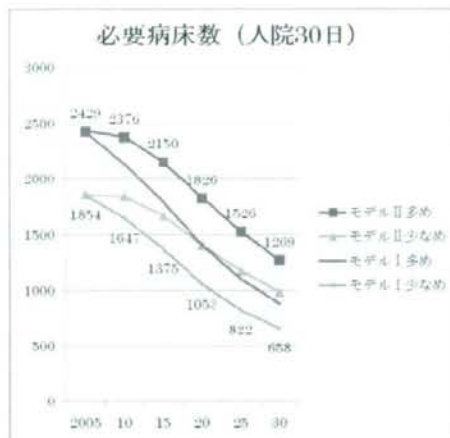
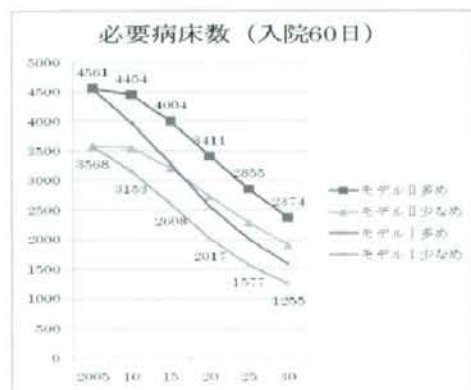
(10) 結核病床の今後のあり方(別添吉山報告参照)

(a) 必要病床数の推計

結核患者数の推移予測<sup>1)</sup>のうち最も可能性の高いモデル(モデル1)での推移および患者数が多く残ると思われるモデル(モデル2)の値をもとに、入院期間60日及び30日に仮定した場合の必要病床数の多め、少なめの将来予測を以下のとおりである。

必要病床数は患者推移の予測数及び入院日数によって大きく変動する。

2005年の都道府県毎の必要病床数は入院期間を60日として、一病棟の病床数を45とした場合、それを下回る府県が半数程度となっている。



(b) 病床数調査

回答が得られた病院の許可病床数 7506床に対して稼働している結核病床は 4902床(64%)とかなり少ない。そのうち、陰圧室は概ね半数の 2520病床であった。感染症病床、モデル病床を加えると結核患者を受け入れ可能な陰圧病床は 2900床程度であった。この陰圧病床数は北海道東北、北陸、山陰の全県で、すでに、陰圧結核病床数は必要病床数より多くなっているが、大都市圏(南関東、愛知、京都、大阪、兵庫)では、感染症病床の全陰圧室を動員しても、結核患者を受け入れるに十分ではなかった。

D. 考察

(1) 薬剤耐性の調査:

日本における XDR は本研究班において豊田らが 2006年に国立病院機構のネットワークを介して実施した調査においては新規入院 MDR93例中 12例(12.9%)占めており、同じく、持続排菌 103例中 31例(43%)が XDRであった。日本の MDRの率は諸外国と比較して高くないが、MDRにおける XDRの率は高いようである。この理由は、感染制御、何らかの耐性を持った患者の治

(FGG-Reformgesetz - FGG-RG)

療など種々考えられるが、さらに調査・検討が必要である。

全国薬剤耐性結核調査については検体収集期間を延長した結果、予定していた収集検体数を達成したが、参加施設数は前回の約3分の2と少ない。改正感染症法における病原体管理強化によって保管のための施設基準が設定されたため、分離された菌を即滅菌する施設もあり、MDR菌の輸送コストが極めて高額であるため、実質上困難になっていることから、全国薬剤感受性検査として不十分なものになった。欧米先進国で構築されているような病原体サーベイランスシステムが必要になっていると考えられる。

2009年2月末に全体の約3分の1にあたる1309例の検査が終了した段階で薬剤耐性はSMを除き有意に減少していた結果は、日本版DOTSの普及等によって薬剤耐性の発生が減少している可能性があるが、検体の輸送の問題等のために過小評価している可能性も考えられる。

#### (2) 分子疫学的研究：

欧米における結核菌遺伝子タイピングはRFLP法からMIRU(12)あるいはSupply(15)を用いたVNTR法に移行しつつあるが、我が国あるいはアジアに多い北京株での判別性が低いと、我が国に適したlocusの選定が課題であった。

JATA(12)の識別能は集団感染が疑われる事例で同一由来菌であるか否かの判断のためにはほとんど問題がないことが経験的にわかっているが、地域での全数分析にはRFLPと同様の識別能が望まれる。Locusの選定の検討を種々行った結果、安定部位のみでは十分な識別能が得られないこ

とから、高頻度変化部位4-5か所を加えた改良法を用いるとRFLPに同等あるいはそれ以上の識別能が得られることが判明した。東京及び沖縄から得られた菌株と同様の結果であったが、さらにいくつかの地域で検討を行い確認した上で、全国的な展開を図りたい。

#### (3) 診断技術：

結核菌の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を判断することは迅速で精度の高い方法であり、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。

ダイレクトシーケンス法によって、PCRから塩基配列の解析までを6.5時間内に完了で、精度も高く、薬剤感受性検出法として有用と考えられるが、高価なシーケンサーと試薬が必要である。そこで、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。

また抗酸菌種同定法とリファンピシン、イソニアジドといった頻用される薬剤に対する感受性を判断することは、治療効率をあげる上で非常に重要である。しかし、既知のイソニアジド耐性に関わる*katG*、*inhA*、*inhA*のプロモーター領域における遺伝子変異はイソニアジド耐性株60%程度とされていることから、新たな領域を設定して解析を行った。その結果、22種類の新規変異を見出し、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

結果がイソニアジド耐性結核菌の検出率の向上に直結するとは限らず、それぞれの変異の機能を解析する必要があり、有用な変異を取り込んだラインプロブ作成を行っていく。

#### (4) 精度管理と定点監視体制の確立：

##### (a) 薬剤感受性検査の外部精度評価

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% を超えていたことから、総合的には十分な精度と考えられたが、施設によって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。外部精度評価の結果を受けて実施した改善活動は精度が高い施設においては行われていた。

今後、外部精度管理制度として定着させるためには、参加するメリットとして認定制度や精度の著しく低い施設に対する何らかの対処法を検討する必要がある。

##### (b) 人工痰

患者喀痰を利用して検体を作製する場合と異なり、完全な陰性を保証できること、検体間の差異が殆どないこと、あるいは必要に応じていつでも準備することができる点などで優れていることから、今後の精度管理事業への応用が期待される。

##### (c) 薬剤耐性状況定点観測

定点観測医療機関のデータは 2007 年療研調査と比較すると、主要 4 剤の耐性率が高かった。これは、定点観測対象の医療機関がそれぞれの地域における主要な結核診療施設であるため、紹介等によって耐性患者が集積するバイアスが考えられる。さらに 2007 年療研調査では感染症法の規定上 MDR 菌（三種病原体）の輸送が困難になっ

ており、それぞれの医療機関で分離されても送付されなかった菌株があると想定され、過少評価となっている可能性がある。

##### (5) 日本版 DOTS：

MDR は重要な対策課題となっている現在、質の高い DOTS の実践を通してこの課題に対応しなければならない

20 年度は先行システムを改訂し、その試用を通して日本版 DOTS の核心である確実な服薬のための患者支援技術の向上とそれを支援する治療モニタリング・評価について検討した。本システム自体は治療情報処理のための一つのツールに過ぎないが、これは具体的な媒体として試用する現場の職員に対して DOTS という服薬支援活動に対する意識や知識を深める重要な機会を提供したと考えられる。

また治療成績の向上という DOTS 事業の目的を考えると、MDR 治療プログラムへの強力な対応が避けて通れない。

これには医療施設のネットワーク化、コンサルテーションシステムの確立、薬剤感受性検査の精度管理の導入等の課題がある。

##### (6) 薬剤耐性結核の診療システムの確立：

##### (a) MDR 及び超薬剤耐性結核の全国調査

今回の調査で MDR は高齢者、罹患率の高い地域に多く死亡率も高かったが、2006 年新規では 50% 以上が菌陰性化しており、手術療法も併用されている。

XDR は MDR 全体の 29.1%、持続排菌している MDR では、その 43.3% が XDR という結果であった。在宅治療している排菌例 18 例は、患者側の入院拒否が最大の理由で、自宅隔離を指導・管理している。

(b) MDR 菌株の分子疫学的検討ではクラスター形成率は感受性結核菌株と有意差を認めず、また、3 つの大きなクラスターを含

んでおり、MDR 菌にも伝搬しやすい蔓延株が存在することが示唆された。

(c) MDR 肺結核症の外科療法の検討

MDR 肺結核症に対する肺切除術の治療成績はその合併症も含めて極めて良好で、肺切除術は、より積極的に検討されかつ施行されるべきである。今回の検討の結果、切除の対象は主として空洞性結核病巣であり、小散布性病巣は遺残させても構わないこと、可能であれば耐性薬剤数が増えないうちに切除を行うこと、術前3ヶ月以上の有効な化学療法で菌量の減量を図っておくこと、術後断端瘻、膿胸等の防止目的に気管支断端は筋弁等で被覆しておくこと、術前に喀痰の排菌が停止しても安易に治癒を期待せず、その時こそ切除の良いタイミングであると考えべき事などが示唆された。

(e) MDR 菌株のクラスター形成率は同時期に行った MDR でない結核菌株のクラスター形成率とほぼ同等であった。MDR 菌にも流行株が存在することが示唆された。MD のスーパースプレッダー (super-spreader) の発見は結核病床の個室化の必要性を改めて示すものであった。

(f) MDR 患者では NRAMP1 の SNPs パターン (Asn 543 Asp) に違いが認められ、MDR-TB 患者では菌の細胞内処理の違いが関係する可能性が示唆された。

(g) MDR 患者では granulysin 蛋白発現の低下が示唆された。さらにこれらの Tg マウスを作製した。その結果生体内結核菌数の低下が認められた。

(7) 小児結核の予防方策及び診療システムの確立:

(a) 小児を対象とした QFT 反応性の検討:

小児においては QFT 陽性を結核発症の可能性を強く示唆する所見として評価する必要があるが、QFT 陽性を呈さなかった菌陽性例も見られることから、QFT のみではなく、良質な検体による細菌学的検査、慎重な画像的検索、さらに問診やツ反結果を併せた総合的な評価に基づく診断が重要である。

(b) 小児例の感染判断では QFT 検査の反応特性を考慮に入れることが重要である。すなわち、年齢や基礎疾患、BCG 接種歴、感染源の病型と排菌の程度、接触状況、周囲の発病・感染者の出現状況などを総合的に勘案してリスク評価を行ない、①乳幼児・学童に対してはツ反を優先して、②中学生以上に対しては QFT を優先 (必要に応じてツ反を併用) して感染判断を行う姿勢が適当である。さらに発症の可能性も念頭に胸部画像所見を慎重に検討する必要がある。

上記の検討結果を基に“小児結核感染診断における QFT-2G 使用指針”試案を作成した。

2種の IGRAs (T-SPOT と QFT) の反応性を比較では、T-SPOT が QFT やツ反に優る良好な感度を有することを期待させる反面、特異度が低い可能性も憂慮される。今後、検討対象例を増やすと共に、T-SPOT 陽性例からの発症の有無の追跡や感染源との接触歴を有しない乳幼児群における T-SPOT 反応性の検討も必要である。

(c) BCG 接種後1週間以内の局所反応が grade3 以上であり、かつ経過中に反応が減弱しない場合にはコッホ現象の可能性が考えられるため、BCG 接種後遅くとも2週間

以内にツベルクリン検査を実施すべきであると考えられる。

#### (d) 小児結核症例検討会

症例検討会の定期開催により、①小児結核症例共通の問題点を明らかにできた、②小児結核発症例をアピールする機会となった、③小児 LTBI の適切な診断と治療完遂の重要性を伝える機会となった、④自治体や医療機関を超えた小児結核に携わる医療・保健関係者の横のつながりを構築することができた、等の成果を上げている。これらの成果は、(e)小児結核発症状況に関する検討と合わせて直接的、間接的に小児結核患者数減少につながっているものとする。

#### (f) BCG 皮膚炎・骨炎症例

BCG 骨炎症例のアンケート調査によって骨炎症状出現までの期間、罹患部位、初診時症状・所見などは1980年代にBCG骨炎が多発したスウェーデンやフィンランドから報告された内容とほぼ合致していた。また、増加傾向は未熟な乳児早期での接種例が急増したことの影響が強く疑われた。骨炎は長期の抗結核剤服用と外科的治療を要する重篤なワクチン接種後副反応であり、正確な発生頻度評価と増加要因の解明が強く望まれる。

#### (g) HIV 合併結核：

今回の調査では、菌陽性患者との接触があったと考えられる場合の潜在性結核感染治療の方針については、接触が濃厚であった場合のみに行くが72%、次いで接触した結核患者が喀痰塗抹陽性の場合に行くが58%で高かったが、佐々木らの調査では、HIV合併結核の168例中42例(25%)がHIV感染診断先行例であり<sup>1)</sup>、HIV感染者への結核

発病予防の是非を検討する必要があることを示唆している。

全国入院結核患者 HIV 感染合併調査では、首都圏に属する施設では比較的高い回答率・参加率が得られたものの、全国平均参加率は20%に届かず、効率性から考えると今回の調査に参加した施設を定点調査を行う方が望ましいと思われる。

対象施設における調査期間で補正した結核患者中の HIV 陽性率は0.37%であった。2007年から開始された登録患者情報システムにおける HIV 合併率は0.2%とされているが、これは不明の数も分母に含められていることを考慮すると本調査の合併率はこれと整合する範囲と考えられる。

全国 HIV 感染合併抗酸菌症アンケート調査では、参加との回答率が47.7%あったが、実際に症例として報告を頂いたのは33施設に限られており、症例が集中していた施設があることが認められた。

エイズ診断が先行して次いで結核菌症が診断される割合は出生国日本群で37.8%、出生国が外国群で32.3%と、まだ高くないことが示唆された。結核菌症の診断の契機としては「有症状受診」が80%を占め、いわゆる「いきなりエイズ」症例が多いことが推察された。

HIV 診断が先行した早期発見例で潜在性結核感染症治療 (INH 予防投与) が行われた症例は認められなかった。国際的に WHO が提唱する Three I's (Intensive case finding, INH preventive therapy, Infection control) が推進されていることから、潜在性結核感染症の診断・治療は重要検討課題と思われる。

#### (9) 長期入院患者調査：

発生動向調査での慢性排菌患者数は近年減少しており、日本版DOTSの普及が役立っているものと考えられ、今後とも減少を続けるものと期待される。入院したきりになっている患者も100名程度おり、QOLの点から問題である。感染予防措置については、家族とも面会も避けている人がいる一方で、全く感染予防措置をとっていない患者もおり、これらの慢性排菌患者に対する人権と感染予防のバランスをとった指針を検討する必要がある。

オランダ、ドイツでは強制隔離施設及び患者の人権にも配慮した制度及びが整備されており、感染性がある入院に從わなくて公衆衛生的な脅威となる患者がこの制度の下に入院していた。対象となる患者はほとんどが精神疾患あるいは薬物中毒であった。しかし、ドイツではこの制度があることによって、入院を拒否する患者でも必要な場合には病院に入院するようになる。わが国においても、このような施設及び制度の整備を計る必要があるものと考えられた。

薬剤耐性患者に対する強制隔離等の措置の必要性は、(a)前提として、立法上も制度運用上も、人身の自由や医療の場面における自己決定権は非常に強く尊重されるべき権利であるという認識がある。その上で、(b)公衆の安全・健康を守る必要性が高いという観点もまた重視されるべきであり、(c)その結果、一部の患者が自由を制約されることはやむを得ないと解されるとしても、かかる強制措置は、それが必要最小限度にとどまること等、厳しい規律の下でのみ正当化されるものであるし、当該措置の前後においては、裁判手続を含む慎重な手続保

障が必要不可欠であると解されていた。

わが国における制度設計及び運用を構想する際にも、これら(a)～(c)は非常に参考になる視点である。

ハンセン病問題に関して、国の誤った感染症対策によって著しい人権侵害が存在したことは忘れられてはならない。一方、公共の安全という観点から、感染性のリスクを、誰がどのような手続を経て、いかなるレベルで判断・認定するかという問題がある。感染まん延のおそれや退院の遅延などの深刻なデメリットにつながるおそれがあり、科学的合理性と社会的合理性とをいかに調和できるか、という視点からの議論が必要となってくる。

わが国にも、一定の法律関係に関する事項につき裁判所が通常の訴訟手続にはよらず、簡易な手続で処理をして公権的な判断をする事件類型が存するが、このような事件は多様化しており、最近、同法の改正に向けた議論が始まったところでもある

患者の手続的な権利保障のあり方をめぐっては、今後も海外の事例等も参考にしつつ、多様な観点から議論をする必要があると思われる。

#### (10) 結核病床の今後のあり方

病床予測では今後とも必要結核病床数は減少を続ける見込みであるが、患者予測数とともに入院期間によって大きく変動する。患者の人権、QOL、医療費の観点から、入院期間は科学的な根拠に基づいて感染防御が確実に行われる範囲で可能な限り短くすることが望ましいが、今後の病床数を決める観点から、新技術・知見に基づく入退院基準を早急に検討する必要がある。

2005年の都道府県の必要病床予測からは、

通常1病棟単位の病床数45以下となっているのは半数程度になっており、病棟のユニット化あるいは病床単位で結核病床を設置・運営可能な方向で制度改革を行っていく必要がある。

許可病床のうち実際に稼働していない割合は少なくないが、稼働病床の半分は陰圧室である。北海道、東北、北陸、山陰の全県で、すでに、陰圧結核病床数は必要病床数より多くなっているが、大都市圏では、結核患者を受け入れることが難しい陰圧室も含めた感染症病床等の全陰圧室を動員しても、結核患者に十分ではなく、今後とも病室確保の努力が必要である。さらに、地域によっては、患者の医療機関へのアクセスが問題となっている地域もある。医療提供の効率、質の確保とともに患者の医療へのアクセスも考慮に入れながら、感染防御を確実にできるように医療提供体制を再構築する必要がある。

#### E. 結論

これからの結核対策における最優先課題である耐性結核菌の発生予防、診断、治療法の確立を目的として、薬剤耐性の実態調査、薬剤耐性の分子疫学的研究、薬剤耐性の診断技術の開発、精度管理と定点監視体制の確立、耐性結核予防のための保健所・主治医連携システム、患者支援システムの策定、耐性結核の診療システムの確立、小児結核の予防方策及び診療システムの確立、日本の HIV 合併結核、結核病床のあり方に関する研究を行い、対策の推進に大いに役立てられる成果を挙げることができた。

#### <参考文献>

1) 大森正子、吉山崇、石川信克、日本の結

核蔓延に関する将来予測、結核  
2008;83:365-377、

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし（今後、予定）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## II 研究分担報告書



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究分担報告書

薬剤耐性の実態調査

研究分担者：

山岸 文雄 独立行政法人国立病院機構千葉東病院 院長

#### 研究要旨

日本における結核菌の薬剤耐性状況を明らかにすることを目的として、全国調査を実施した。平成18年度には結核の薬剤耐性に関連し、結核療法研究協議会（療研）2002年度全国薬剤耐性サーベイランスにおいて収集された多剤耐性菌（MDR-TB）について、二次薬を中心とする Isoniazid (INH) 及び Rifampicin (RFP) 以外の抗結核薬に関する薬剤感受性を調査した。また、2007年度に実施予定の全国調査について実施内容を検討し、プロトコールを作成した。平成19年度からは第14回となる耐性結核菌全国調査を開始しており、平成20年度までに検体の収集と解析を開始した。

MDR-TB については、全ての一次抗結核薬（INH, RFP, Streptomycin, Ethambutol, and Pyrazinamide: PZA）に対して耐性を持つ株が45.5%であり、2種類以上あるいは3種類以上有効な薬剤が存在する株がそれぞれ78.2%および63.6%あることが示された。また、世界保健機関が提唱する Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB) も30.9% (17/55) 存在し、世界的にみても高率であることが示された。

平成19年8月から開始した全国調査には、第13回の約2/3である63の結核診療施設が参加し、翌20年7月31日までに抗酸菌3,647株が地域的代表性をほぼ満たした状態で収集された。平成20年度末までにその35.9%にあたる1,309株の結核菌について薬剤感受性検査を実施し、結果としてINH、RFP、SM及びEBに対する Combined any resistance はそれぞれ3.2%、0.8%、6.5%及び0.8%であり、MDR については0.5%となった。これらの耐性率はあくまで2009年2月末時点での中間データであるが、2002年に比較して低下していると思われた。

2007年に改正された感染症法において三種病原体と位置づけられた多剤耐性結核菌の輸送や保管が困難であること、あるいは参加施設数の減少から、今回の全国調査では分離されても分与されなかった株が多くあると考えられ、耐性について過小評価傾向であることが懸念される。

#### A. 研究目的

結核感染症は基本的に標準的な治療法によって治癒する疾患である。しかしながら、感染している結核菌に薬剤耐性が存在すると事情は一変する。特に Isoniazid (INH) と Rifampicin (RFP) に耐性を有する多剤耐性結核菌 (MDR-TB) は

多剤耐性結核は治療困難な疾患であり、

有効な薬剤の種類は予後に直接影響するが、基本的に二次抗結核薬に頼らざるを得ない場合が多い。2002年度に実施された結核療法研究協議会（療研）では60株の多剤耐性結核菌が分離されたが、この多剤耐性菌について、INH・RFP以外の抗結核薬に対する耐性を調査し、多剤耐性結核に対する残された化学療法の可能性を検討する。

2007年度に第14回となる療研結核菌薬剤耐性全国サーベイランスを実施する予定である。これに先がけて、感染症法改正による結核菌（特に多剤耐性菌）の取り扱いと輸送方法の厳格化を考慮し、さらに他の疫学的研究を勘案して研究プロトコル作成を行う。

#### B. 研究方法

平成18年度は、2002年の第13回療研調査で分離された多剤耐性結核菌60株を主な対象として、INH、RFP、Streptomycin (SM)、Ethambutol (EB)以外の抗結核薬に対する薬剤感受性状況を調査した。また、第14回療研調査のため、2005年時点の結核感染症学状況と平成19年6月1日施行の新感染症法における結核菌取り扱い基準を勘案して研究プロトコルを準備した。

平成19年度からは、準備したプロトコルに従って研究参加施設を募り、平成19年8月1日より抗酸菌（結核菌）の収集を開始した。なお、従来6月1日より半年間実施していた抗酸菌の収集は、今回感染症法改正による病原体等管理基準の厳格化による現場への影響を考慮して8月1日とした。最終的に設定した目標検体数を確保することを目的として、平成20年7月31日まで検体収集を継続した。

#### C. 研究結果

第13回療研調査にて全国から収集された多剤耐性結核菌55株について、Pyrazinamide (PZA)とFluoroquinolone (FQs)を含む二次抗結核薬の薬剤感受性検査を行ったところ、INH 0.2 $\mu$ g/ml に対する耐性は100%であるが、1.0 $\mu$ g/ml に対する耐性は

83.6%であった。また、全ての一次薬 (INH、RFP、SM、EB 及び PZA) に耐性を有する割合は45.5%であった。また、対象とした全ての薬剤に耐性を示した株も4株 (7.2%) 認められた。さらに、超多剤耐性結核菌も17株 (30.9%) 存在することが示された。

第14回療研調査では、最終的に全国から3,647株の抗酸菌を収集した。第13回の療研調査時と同等の非結核性抗酸菌分離率であれば、この株数からおおよそ2,900株の結核菌が分離されると予想される。これは予定していた結核菌株数3,110株に対して93.8%の収集率であった。

2009年2月28日時点で結核菌1,309株の感受性検査が終了しており、結果はINH、RFP、SM 及び EB に対する Combined any resistance はそれぞれ3.2%、0.8%、6.5%及び0.8%であり、MDRについては0.5%となった。このデータは検体到着順に実施されたものであるため地域的な偏りもあり、現時点で未治療・既治療の分類も行っていないため、限定的なデータである。

#### D. 考察

日本には結核菌に関する病原体サーベイランスシステムがないため、療研によるおおよそ5年ごとの結核菌薬剤耐性全国調査がほぼ唯一のサーベイ情報であり、世界的にも日本の体制結核サーベイとして認識されている。今回第13回療研調査収集結核菌株の継続解析と第14回となる新たな全国調査を実施した。これによって、世界的に問題となっている多剤及び超多剤耐性結核の存在とその比率が明らかになり、さらに国内では継続して耐性率が低下していると推測させる結果も示された。これは日本版

DOTS の徹底を初めとする結核対策が有効に機能していることを示すものと考えられる。しかしながら、これまで再三指摘されているように、臨床分離結核菌株の収集方法が任意の参加施設による株の提供に依存しているため、サンプルの精密な代表性の確保が困難である。また毎年 Up to date な情報を得ることができないため、万一急速な変化が起こった場合、対策上即応できない可能性がある。検査精度そのものを含めたデータの精度の維持を考慮すると、今後は新たな病原体サーベイランスシステムを構築する必要があるものと考えられる。

#### E. 結論

#### F. 健康危機情報

本研究においては、特に多剤耐性菌の感受性検査実施において、感染の危険があった。全ての結核菌の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従って BSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. Mitarai S. Drug-resistant TB in Japan. Taiwan-Japan Symposium on TB and International Collaboration. Taipei, September 11-13, 2008.
2. 阿部千代治, 小林郁夫, 御手洗聡, 和田雅子, 川辺芳子, 高嶋哲也, 鈴木克洋, 尾形英雄. イソニアジド耐性結核菌の耐性に関する遺伝子の変異. 第 83 回日本結核病学会総会 東京 2008 年 4 月 24, 25 日
3. 御手洗聡. 結核菌検査指針改訂と耐性菌の現状 (教育セミナー). 第 19 回日本臨床微生物学会学術集会 東京 2008 年 1 月 27 日
4. 御手洗聡. 結核の感染対策 (教育講演). 第 23 回日本環境感染学会総会 長崎 2008 年 2 月 23 日
5. 御手洗聡: 日本における多剤耐性結核と超多剤耐性結核. 日本化学療法学会総会 仙台 2007 年 6 月 1 日
6. 村瀬良朗, 前田伸司, 大友幸二, 山田博之, 御手洗聡: 2002 年度療研多剤耐性結核菌の分子疫学. 日本結核病学会総会 大阪 2007 年 6 月 5 日
7. 御手洗聡, 阿部千代治, 小林郁夫, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 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. 日本結核病学会総会 大阪 2007 年 6 月 5 日
8. Mitarai S, Otomo K, Yamada H, Mizuno K, Maeda S, Murase Y. Extensively Drug Resistant (XDR) tuberculosis in Japan. 38th World conference on IUATLD. Cape Town, South Africa 2007.
9. Mitarai S (RYOKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide survey, 2002. 12th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Haikou, China 2007

原著論文

1. 御手洗聡. 超多剤耐性結核菌の現状と対策. 感染症. 2008; 37: 224-236.
2. 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. 2008; 83: 673-678.
3. 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. 2008; 57: 873-880.
4. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Kawabe Y, Takashima T, Suzuki K, Sng LH, Wang S, Htay HH, Ogata H. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level 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.

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・水野和重・山田博之・近松絹代・大友幸二  
結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検科

結核菌の迅速型別法の開発と国内結核菌の型別への応用

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

現在の結核菌型別の標準法である IS6110 制限酵素断片長多型分析（RFLP）分析に代わる、PCR を利用した反復配列多型（VNTR）分析法の国内での利用について検討を行った。米国やヨーロッパで採用されている分析法では識別能が低いいため、国内株分析に最適な VNTR システム構築の検討を行い、12 箇所のミニサテライト DNA を調べることで、IS6110 RFLP と同程度以上の型別能力を持った VNTR システムを構築した。この Japan Anti-Tuberculosis Association（JATA）(12)-VNTR システムで集団感染・院内感染事例を分析すると、RFLP 分析による型別結果と一致することが確認できた。しかし、特定地域内での分子疫学調査に実際に応用するとクラスター形成率は高いため識別能は、IS6110 RFLP 分析よりかなり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新しい VNTR システムの構築を行った。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傾向がみられた。

A. 研究の目的

特定の場所での集団感染や院内感染疑い例が発生した場合、結核菌型別を依頼されることが多い。挿入配列（IS）6110 を利用した制限酵素断片長多型分析（RFLP）が、現在の結核菌型別の標準法となっている。しかし、この分析法は、精製した高分子 DNA が必要であり、さらに結果を得るのに少なくとも 4 日必要である。また、生きた菌を分析施設に運ばなければならず、第三種病原体と規定されている多剤耐性菌の場

合、輸送が困難な状況である。近年、新しく開発された菌のミニサテライト DNA を比較する反復配列多型（VNTR）分析は、PCR を利用する方法であり、粗抽出 DNA を利用できるため 2 日で結果が得られる。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。しかし、これら方法を日本国内の株に適用すると大きなクラスターが残り、型別能力は高くな

いことが報告された。この原因として日本国内では、北京型結核菌が 7-8 割を占めていることが考えられる。VNTR 分析では、locus の選択が重要であり、効率よく国内株を分析するためには、適切な locus の選択が必要である。結核研究所では日本全国から集めた株を分析し、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. 研究方法

- ・分析した結核菌：2002 年結核療法研究協議会が感受性検査のために全国から集めた 3122 株の内、都道府県ごと 3-10 株となるようにランダムに選んだ 325 株について分析を行った。また、地域内で発生した結核菌の解析には、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。
- ・分子疫学的解析：IS6110 RFLP、スポリゴタイピング及び 35 loci（北京型結核菌を効率よく型別できると考えられる）について VNTR 分析で型別を行った。
- ・各分析法の評価：クラスター形成率、Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI)等を利用して、型別能力の比較を行った。また、個々の locus のコピー数の多様性（型別能力）は、 $h$  値を用いて比較した。

## C. 結果

日本国内（全国）で分離された 325 株を IS6110 RFLP 分析及びスポリゴタイピング法で分析したところ、クラスター形成率は、それぞれ 18.5% (60/325)、90.2% (293/325) であった。スポリゴタイピング法でクラスター形成率が高いのは、分析した結核菌の約 7 割 (70.2%) が“北京型”と定義されている遺伝子型（スポリゴタイピング法で同一パターン）を持つためである。そのため、このスポリゴタイピング法は、日本国内での結核菌の型別では効率が高くないことが確認できた。次に 35 loci について VNTR 分析を行い、 $h$  値を利用して個々の locus における多様性を比較した。この  $h$  値は、0 から 1 までの値をとり、1 に近いほど型別能力が高いということを表す。locus によって  $h$  値は異なり、最大は VNTR 3232 で 0.929、最低は VNTR 0154 (MIRU-02) で 0.018 だった。 $h$  値が高い locus をいくつか分析すると、IS6110 RFLP より高い識別能をもつ VNTR システムを構築できる。しかし、 $h$  値が高い locus では、高い頻度で分析の際に得られる PCR 産物の分子量が大きく (1 kb 以上)、繰り返し配列 1 単位 (53 bp-77 bp) の違いをアガロースゲル電気泳動では、区別することは困難であり、分析精度が確保できないことが予想される。そのため、 $h$  値が高いが、実際の分析際に困難が伴うと考えられる 4 つの loci（高頻度変位部位：Hyper variable）を除いた上で、IS6110 RFLP 分析と同程度の HGDI を持ち、さらにクラスター形成率等が RFLP 分析より優れている 12 loci を選択し、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12) とした。Supply が提唱した 15-locus (Supply [15])-VNTR が、

ヨーロッパ諸国で採用されている。この Supply (15)と JATA (12)のクラスター形成率の比較を行った。その結果、12 箇所を分析する JATA (12)は、15 箇所を分析する Supply (15)および現在の結核菌型別の標準法である IS6110 RFLP より、クラスター率は低く優れていることが明らかになった。

次に実際の分子疫学調査を本分析法で行った。東京都内で分離された 146 株の結核菌を用いて分析を行い、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。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 箇所を調べる 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ることから集団発生疑い事例が多くなる。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 分析法の改良を行う必要がある。

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。東京都内で分離された 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がみられた。

#### D. 考察

欧米で採用されている Supply (15)-VNTR で日本国内の株を分析すると米国 CDC が採用している MIRU-VNTR より型別能力は高いが、大きなクラスターが残ることが報告されている。本研究で樹立した JATA (12)-VNTR は、12 箇所の分析にも関わらず、15 箇所分析する Supply (15)より分解能が高いことが明らかになった。また、集団感染や院内感染疑い例を使った分析では、各事例内で RFLP 分析が同一パターンとなった例では、すべて JATA (12)-VNTR でも同一プロファイルとなった。一方、RFLP パターンが異なった例、つまり、同時発生病例では、1 例を除いて JATA (12)-VNTR で分析を行うと少なくとも 5 以上の loci でコピー数が異なることが確認できた。

全国から集めた株で IS6110 RFLP 分析におけるクラスター形成率は、18.5%であるのに対して、東京都内から分離された株では 34.7%とほぼ 2 倍であった。大都市で RFLP 分析でのクラスター形成率が高いと

いうことは、類似した特定パターンの株が広まっている可能性が高い。そのため、それらの株を分類するためには、JATA(12)だけではなく追加ローサイの分析が必要となるものと考えられる。JATA(12)-VNTR 改良法は、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、観察できなかった。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される。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

JATA(12)-VNTR は、集団感染・院内感染疑い例では、十分な識別能を持っていることが明らかになった。また、VNTR 分析では、1 locus でコピー数が異なっても同一株と判定すべき、という結果が得られたことから、少なくとも 2 loci 以上でコピー数が異なる場合、別株と判定する必要があるこ

とが示唆された。また、人口ベースの分子疫学調査に JATA(12)-VNTR を導入した場合、識別能が低い（クラスター形成率が高く）ことから 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 VNTR 4120 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) 鹿住祐子、前田伸司、菅原勇： *rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み、結核. 2006; 81: 511-518.
- (2) 前田伸司：沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 第 81 回総会シンポジウム I. 結核分子疫学の新展開. 結核. 2006; 81: 694-696.
- (3) Wada T, Maeda S, Hase A, Kobayashi K: Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat as Molecular Epidemiological Markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: J Med Microbiol. 2007; 56: 1052-1067.
- (4) 前田伸司、小林和夫：結核菌および非結核性抗酸菌、臨床検査. 2007; 51: 1507-1510.
- (5) 前田伸司、菅原勇、加藤誠也：日本、中国、韓国における結核分子疫学担当者会議開催報告. 結核. 2007; 82:



925-927.

- (6) 鹿住祐子、宇田川忠、前田伸司、村瀬良朗、菅原勇、奥村昌夫、東由桂、後藤美江子、常松範子：*Mycobacterium avium* タイピングにおける Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法と Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の有用性の比較。結核。2007; 82: 741-748.
- (7) 和田崇之、前田伸司：抗酸菌の分子疫学。呼吸器科。2008; 13: 92-98.
- (8) 前田伸司、和田崇之：抗酸菌の分子疫学解析とその応用。Medical Technology。2008; 36: 170-175.
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 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。沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題。第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (2) 村瀬良朗, 大角晃弘, 前田伸司。東京都から分離された結核菌を用いた分子疫学解析。第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (3) 鹿住祐子、村瀬良朗、前田伸司、菅原勇、後藤美江子、奥村昌夫。VNTR 法による病態別 *M. avium* の分類。第 81 回日本結核病学会総会, 2006 年 4 月, 仙台市.
- (4) Murase Y, Maeda S, Ohkado A, Uchimura K, Nagamine M, Kato S: Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) for Molecular Typing using *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Tokyo. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (5) Ohkado A, Nagamine M, Murase Y, Uchimura K, Yamada N, Ohmori M, Maeda S, Maeda H, Kato S, Mori T, Ishikawa N: A population-based DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* in an urban area in Japan - Clustering and Homelessness. The 11<sup>th</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.
- (6) Uchimura K, Nagamine M, Ohkado A, Maeda S, Murase Y, Kato S, Mori T, Ishikawa N: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in an Urban Setting in Japan and its Association with

Age, Sex and Homelessness. The 11th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), November 19-22 2006, Kyoto.

- (7) 前田伸司、村瀬良朗：反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化. 第82回日本結核病学会総会. 2007年6月, 大阪市.
- (8) 村瀬良朗、前田伸司、大友幸二、山田博之、御手洗聡：2002年度療研多剤耐性結核菌の分子疫学. 第82回日本結核病学会総会. 2007年6月, 大阪市.
- (9) 和田崇之、長谷篤、前田伸司、ShiRuiru、菅原勇、松本壮吉、岩本朋忠：日本国内の北京型結核菌に見られる遺伝的特性. 第82回日本結核病学会総会. 2007年6月, 大阪市.
- (10) 和田崇之、長谷篤、平山幸雄、前田伸司：大阪市内の行旅患者から分離された結核菌の遺伝型別解析. 第82回日本結核病学会総会. 2007年6月, 大阪市.
- (11) 鹿住祐子、村瀬良朗、前田伸司、菅原勇、後藤美江子、奥村昌夫：*M. avium*におけるVNTR法の解析. 第82回日本結核病学会総会. 2007年6月, 大阪市.
- (12) 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
- (13) 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
- (14) 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

- (15) 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

分担研究者：

切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

### 研究要旨

結核菌の薬剤感受性試験は結果が判明するまでに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。平成 18 年度は、ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核診断法を開発した。わずか 6.5 時間で、主要抗結核薬の耐性に関わる 8 遺伝子（領域）内の変異を同定できる。平成 19 年度は、PCR 増幅とラインプローブ法を組み合わせた、より安価でより迅速な遺伝子診断法として、ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法を開発してキット化した。同時に評価試験を開始した。平成 20 年度は、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その評価試験、イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発を推進した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、薬剤感受性試験の代替となる迅速診断技術を開発することである。

結核症の治療において、薬剤感受性を同定することは重要である。しかし、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。

### B. 研究方法

【B-1. ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核診断法の開発】

リファンピシン、イソニアジド、エタンプトール、ピラジナミド、ストレプトマイシン、キノロンの耐性に関わる 8 遺伝子・領域を同一条件で PCR 増幅し、DNA ダイレクトシーケンス法によって変異を同定する（図 1）。PCR：結核患者から分離された結核菌または患者喀痰を前処理し、ゲノ

ム DNA を抽出した。ゲノム DNA を鋳型とし、解析対象に特異的な 8 組のプライマーセットを用いて同一条件で PCR 増幅した。解析対象領域は以下の通り。リファンピシン耐性遺伝子 (*rpoB*)、イソニアジド耐性遺伝子 (*katG*、*inhA* のプロモーター領域)、エタンプトール耐性遺伝子 (*embB*)、ピラジナミド耐性遺伝子 (*pncA*)、ストレプトマイシン耐性遺伝子 (*rpsL*、*rrs*)、キノロン耐性遺伝子 (*gyrA*)。

塩基配列の決定：サイクルシーケンス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。

変異と薬剤耐性の関連検証：結核菌のイソニアジド耐性が、菌体内でのイソニアジドの酸化と関連することが明らかにされている。そこで、カタラーゼ・ペルオキシダーゼ（イソニアジドを酸化する酵素）をコードする遺伝子（*katG*）をクローニングして *E. coli* *DkatG* 内で発現させ、INH に対する酸化活性を測定した。また、結核菌のピラジナミド耐性が、菌株が産生する PZase 活性の消失と関連することが明らかにされている。そこで、PZase をコードする *pncA* 遺伝子内に変異を有する株の PZase 活性を測定した。方法は Wayne, L.G. の方法 (Am. Rev. Respir. Dis. 109:147-151) に従った。

#### 【B-2. ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の開発】

ラインプローブ法：ストリップと呼ばれる膜上に検出したい配列を含むプローブを固相化し、そこへビオチン化プライマーを用いて PCR 増幅した解析対象を結合させる。アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、基質を加えて発色・可視化する。

ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法を開発するため、既知および上述のダイレクトシークエンス法によって同定した新規 *pncA* 変異を検出できるラインプローブを設計・固相化した。*pncA* 変異は ORF 全体に散在したため、遺伝子の全長をカバーするように設計し、ハイブリダイゼーション温度がほぼ一定になるようにした (図 2)。必要なバッファー類を同梱してキット化した (図 3)。

#### 【B-3. ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法の評価試験】

平成 21 年 3 月 17 日現在、結核研究所、

東京病院、三菱化学メディエンス、ニプロと共同し、臨床分離株 102 株に対して、ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法を実施した。薬剤感受性試験については順次実施する予定。

#### 【B-4. 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】

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相化した。

#### 【B-5. 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評価試験】

平成 21 年 3 月 17 日現在、結核研究所、東京病院、ニプロ、その他複数医療施設と共同し、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。

#### 【B-6. 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 4・青色) に加え、独自の解析領域 (図 4・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 4)。