

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。

【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. 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】

主要抗結核薬の耐性に関わる 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方法を開発した。PCR から塩基配列の解析までを 6.5 時間内に完了させることができた。研究成果を論文公表した。

【C-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】

上述のダイレクトシーケンス法を用いて、ピラジナミド耐性遺伝子 *pncA* 内に、複数種類の新規変異を同定した。既知変異情報と合わせ、*pncA* 遺伝子全長をカバーできるラインプローブを設計し、キット化した。研究成果を論文公表した。

【C-3. ピラジナミド耐性遺伝子ラインプローブ法の評価試験】

平成 21 年 3 月 17 日現在、三菱化学メディエンス株式会社において、収集した 102 株に対してピラジナミド耐性遺伝子ラインプローブ法を実施した結果、全株がピラジナミド感受性であるという結果が出た。MGIT を用いたピラジナミド感受性試験は順次実施する予定であり、現時点で検出率は算出できない。今後、ピラジナミド耐性菌を含め、更に 200 株を収集予定である。

【C-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】

キットを作製した（図 5）。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。

【C-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】

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-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】

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 6)。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 7)。

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。

ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核診断法は、主要抗結核薬の耐性遺伝子・領域を同一条件で PCR 増幅して DNA ダイレクトシーケンス法によって変異を同定する方法である。PCR から塩基配列の解析までを 6.5 時間内に完了することがで

きる。精度も高く、薬剤感受性検出法として有用であると考えられる。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。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た、より安価でより迅速な遺伝子診断法を開発した。ダイレクトシーケンス法による変異情報の蓄積から、変異の有無と耐性が強く関連し、かつ薬剤感受性試験が困難なピラジナミドに焦点を絞った。既知変異と本研究で同定した新規変異情報をあわせて、ラインプローブを作製し、キット化した。現在、評価試験中である。

ラインプローブ法を用いた抗酸菌種同定法を開発した。これは、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る。抗酸菌種の同定と、リファンピシンと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。現在、評価試験中である。

抗結核薬の中で最も強力なものは、リファンピシンとイソニアジドである。リファンピシン耐性のほとんど全ては、*rpoB* 遺伝子の限定された領域への変異に起因する。そのため、耐性変異の同定は容易で、検出率もほぼ 100% である。一方で、イソニアジド耐性に関わる遺伝子・領域は複数種類が報告されており、検出率は 60% 程度である。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。イソニアジド耐性菌迅速検出ラインプローブは、機能解析が完了したものから順次ラインプローブを作製し、評価試験を実施する予定である

今後は、評価試験を続けながら、変異情報をさらに蓄積し、ラインプローブをより精度の高いものへ改良していく。

E. 結論

ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性変異の同定は迅速・効率的で有用である。本法を利用して蓄積した変異はすぐにラインプローブへ反映させることができ、迅速・安価・高精度の診断法を提供することができる。キット化することで簡便性が増し、再現性を得ることができる。従来の薬剤感受性試験を代替する方法として有力だと考えられる。一方で、検出率が 100% ではないという事実は、未知の変異、遺伝子が耐性を与えている可能性を示唆している。新規変異、新規遺伝子の同定・探索・機能解析を引き続き実施し、順次ラインプローブに反映させ、より高い検出率を達成

したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, Kirikae T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2007; 45:179-192.

Huang Q, Tonge PJ, Slayden RA, Kirikae T, Ojima I. FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery. Curr Top Med Chem. 2007; 7:527-543.

Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Morita K, Suetake T, Yoshida H, Kato S, Mori T, Kirikae T. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 2007; 45:2802-2807.

2. 学会発表

関口純一郎, 中村友彦, 末竹寿紀, 切替富美子, 秋山徹, 切替照雄: ラインプローブ法によるピラジナミド耐性結核菌の検出法の開発, 第 89 回日本細菌学会関東支部総会, 2006 年, 渋川。

Kirikae T, TB genetic mechanism of drug resistance in *M. tuberculosis* and novel testing techniques., US-JAPAN cooperative medical science program 12th international conference on emerging infectious diseases in the pacific rim Antimicrobial Resistance (AMR) in

respiratory infections., 2007, China.

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1：ダイレクトシーケンス法による薬剤耐性結核診断法。主要抗結核薬の耐性に関与する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。PCRから塩基配列の解析までを6.5時間内に完了できる。

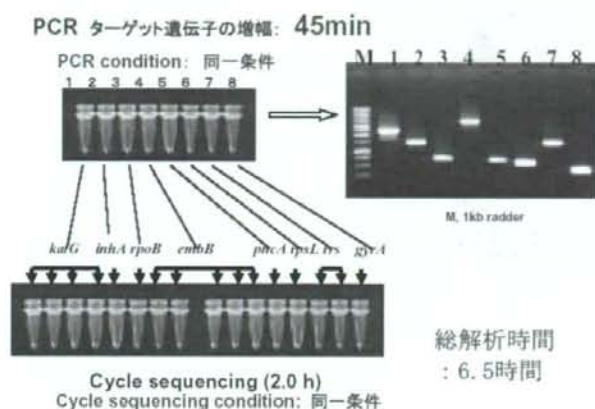


図2：ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法

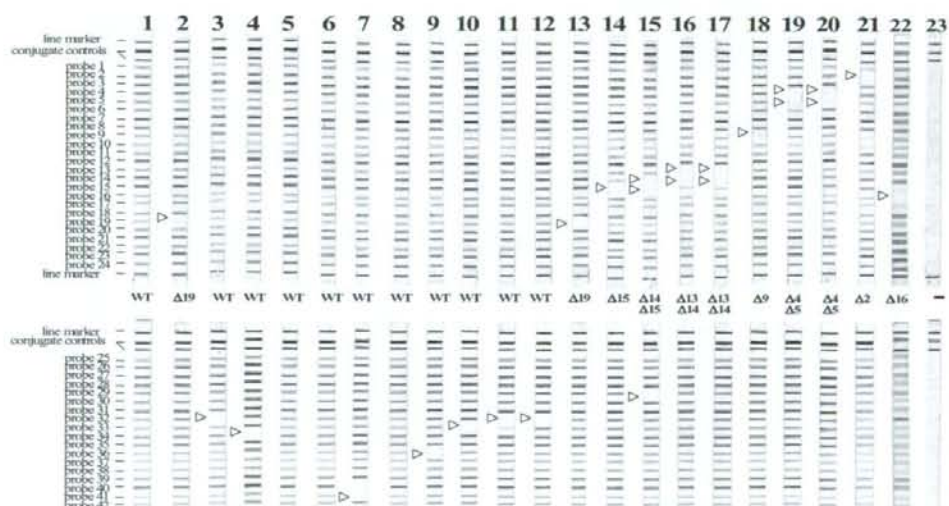


図 3 : ピラジナミド耐性菌迅速検出ラインプローブ法キット



図 4 : 本研究で設定した解析領域。青色は従来の解析領域、赤色は新しく設定した解析領域。

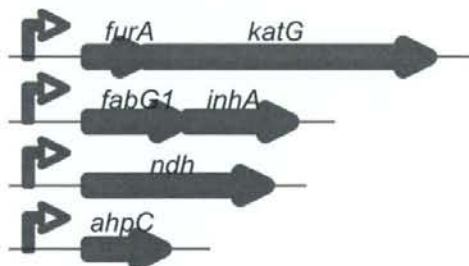


図 5 : 抗酸菌同定および薬剤耐性菌迅速検出ラインプローブ。抗酸菌種 (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*) と薬剤耐性 (リファンピシン, イソニアジド) を同時に検出できる。

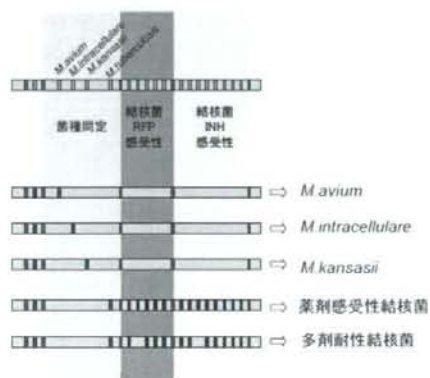


図 6 : 解析結果。

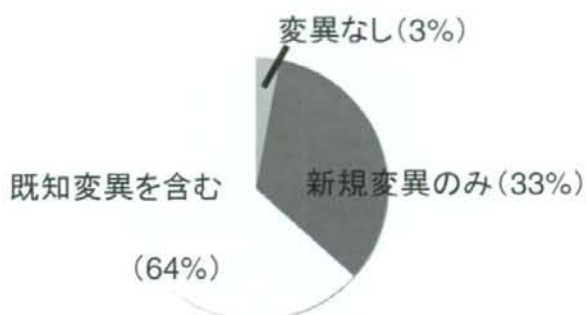
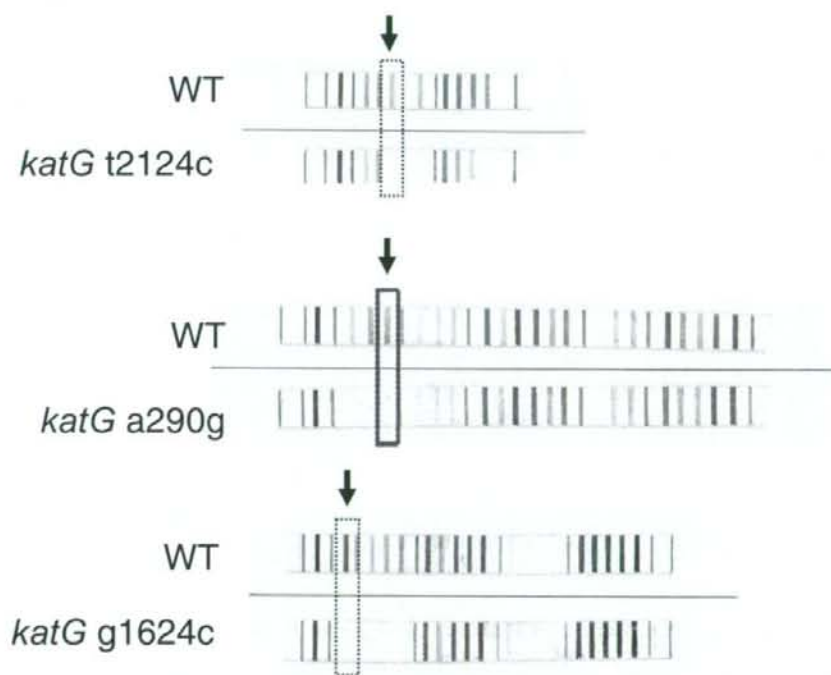


図 7 : イソニアジド耐性菌迅速検出ラインブローブ試作版。変異があるとラインブローブに結合できず、発色しない (ラインは消えたまま)。



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

抗酸菌検査は結核患者の診断や治療方針の決定、さらに治療経過の評価などに重要な技術であり、高い精度が要求されるが、それを体系的に保証するシステムは存在しない。本研究では、抗酸菌検査の外部精度保証を実施する際の具体的な方法や評価基準について検討した。さらに薬剤感受性検査外部精度評価結果を元に、高い検査精度を保証された結核診療施設での耐性結核情報を収集し、定点観測システムとして病原体サーベイランスを実施しうるか否かを評価を行った。

結果として、ポリアクリルアミドあるいはゲノムDNAを基質とする人工痰を作製し、これに適切量の非病原性抗酸菌を添加することによって、塗抹あるいは培養検査上のパネルテストとして利用可能な検体を作製した。この検体は陽性を任意にコントロールできるため、精度の高いパネルテストが実施できるものと考えられた。また薬剤感受性検査の外部精度評価については検体数を変更するなどしながら実践し、最終的に耐性既知の結核菌を10株使用してIsoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM)及びEthambutol (EB)の全ての薬剤に90%以上の一致率を示すことを評価基準として確立した。

前述の薬剤感受性検査外部精度評価を元に、高い検査精度を有する結核診療施設を対象として行った耐性結核菌の定点観測については、同時期の結核療法研究協議会の耐性菌全国調査暫定結果と比較した場合、主要4剤の耐性率が定点観測データで高く、INHとEBの耐性率及び多剤耐性結核菌の率について統計的有意差があった。今回の定点観測システムは、検査精度が先に保証されている点では有利であるが、利用可能な他の耐性データと比較しても高率な傾向があることが明らかとなった。

A. 研究目的

抗酸菌検査は複雑であり、検査件数の減少に伴って精度を維持することが困難となりつつある。しかし、検査の結果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も用いられ、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保証は、治療成功や耐性菌発生の防止の意味でも重要である。

結核研究所では、これまで日本結核学会と

共同で結核菌薬剤感受性検査の外部精度評価を進めてきた。この結核菌検査の精度保証方式を確立し、検査精度認定システムを構築することが第一である。また、外部精度評価により認定された検査施設の所見に基づく薬剤耐性の全国的サーベイランス体制が確立されれば、現在およそ5年おきに実施されている断面調査（結核療法研究協議会による全国結核菌薬剤耐性サーベイ）の反復を代替することも可能となると考えられ、この可能性について検討する

ことも目的とした。

B. 研究方法

【抗酸菌検査外部精度評価】

抗酸菌塗抹検査・培養の外部精度評価を目的として、方法の開発を行った。平成 18 年度には先に試作したポリアクリルアミドゲルを基質とする人工痰の長期保存性や、検体精度について検討した。平成 19 年度にはゲノム DNA によって粘性付与した、NALC-NaOH にて消化可能な人工痰を開発し、精度評価を行った。

薬剤感受性検査外部精度評価については、平成 18-20 年度にかけて検体数の変更を含めて効果的な評価方法を検討し、過去の成績を含めて精度基準の検討を行った。

【薬剤耐性状況定点観測】

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、前述の薬剤感受性検査外部精度評価による精度の保証に基づいて、それぞれ主要な結核診療施設 4-6 施設を対象として結核菌の耐性状況に関するアンケート調査を実施した。データの妥当性の評価として、2007 年度の結核療法研究協議会耐性結核全国調査データ等との相互比較を実施した。

C. 研究結果

【抗酸菌検査外部精度評価】

ポリアクリルアミドを基礎とする人工痰の長期保存について室温保存、4℃保存、-20℃ (凍結) 保存のそれぞれについて検討した。凍結標本でやや基質と細胞成分が分離したように見えたが、エーゼで攪拌すると他の保存検体と同様になり、外観は調製直後の人工痰と同等であった。さらにチール・ネールゼン染色後の鏡検

でも保存検体を相互に比較したが、細胞成分・残渣、繊維成分などに明らかな差はみられず、少なくとも 6 ヶ月保存しても鏡検所見に変化がないことを確認した。検体の作製精度そのものも複数の検査技師により確認した。また長期間培養した THP-1 細胞と BCG、界面活性剤等を使用することで NALC-NaOH にて均質化 (消化) 可能な人工痰 (第二世代) を開発した。マクロ及びマイクロでの外観はポリアクリルアミドによる人工痰と同等であり、生菌保持、核酸増幅法による抗酸菌検出も可能であった。

薬剤感受性検査の外部精度評価については、平成 18 年度に 10 検体、平成 19 年度に 5 検体、さらに平成 20 年度に 10 検体の耐性既知の結核菌を用いてパネルテストを実施した。それぞれの年度で 99 施設、105 施設、89 施設が評価に参加し、それぞれの年度での薬剤別平均判定一致率は表 1 の様になった。

表 1 2006-2008 年度の薬剤別平均判定一致率

薬剤	2006	2007	2008
INH	0.995	0.998	0.996
RFP	0.979	0.984	0.995
SM	0.906	0.943	0.946
EB	0.914	0.974	0.942

2007 年度時点で過去 4 年間 (2004-2007) の外部精度評価成績を総合的に検討し、4 年連続して参加していた 23 の検査施設における累計 55 株のパネルテスト成績を解析し、高精度で安定した結果を示した 16 施設の検査精度をレファレンスデータとして評価基準を設定した。これら 16 施設の 4 年間の評価をみると、INH と RFP の平均感度は 98% 以上であるが、SM と EB の平均感度はそれぞれ 91.7% と 90.3% であった。2004-2007 年の間に、基本的に全ての因

子で施設間の精度の差は認められていないが、SM と EB の一致率に関して年度間で有意差が認められた。この事情を考慮すると、INH と RFP については Supra-National Reference Laboratory Network が定めている感度・特異度 95%以上を基準として採用して良いと思われるものの、SM と EB については感度の基準は 90%程度とする必要があると思われる。また、一致率についても、SM の 95%CI 下限値である 92.3%程度で基準を設定する必要があると思われる。一致率 90%程度を達成するには、被験菌 5 株では完全一致を要求されるため、1 株程度の間違いを許容するためには最低でも 10 株を対象に検査を実施する必要があると判断した。これらの基準を採用した場合、2004 年度から 2008 年度までの各回での基準達成施設率は、それぞれ 72.9%、74.2%、64.6%、63.4%及び 76.2%となった。

パネルテストの結果は、参加施設での菌液調製、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た。

【薬剤耐性状況定点観測】

全国を 7 ブロック計 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。

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、療研 2002 年データとの比較では全ての薬剤で有意な変化を認めなかった。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 2007 年度の調査で有意な耐性率の低下が認められた。

D. 考察

抗酸菌検査外部精度評価のため、塗抹・培養検査に利用可能な抗酸菌を含む人工痰を作製し、精度を評価した。ポリアクリルアミドあるいは THP-1/界面活性剤による人工痰は、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。今後は広範に利用されるよう日本臨床衛生検査技師会などと協力して精度管理事業への応用を考慮すべきと考える。

薬剤感受性検査外部精度評価については、本研究班の活動を通じて具体的な実施手順、評価方法、合格基準の設定などを行った。これによって参加施設の検査精度評価を効率的に実施できるようになったものと考えているが、平成 19 年度以降の実施において多剤耐性結核菌をパネルに使用できなくなったことが既知の事実としてパネルテストの結果にどのように影響したかは不明である。またパネルテストの結果が精度改善に利用されていることは明らかとなったが、特に精度の低い施設がどのように改善活動を実施しているのかさらに追求する必要があると思われる。

耐性結核菌サーベイランスとしての定点観測システムについて、薬剤感受性検査外部精度評価結果を用いて検討したところ、2007 年度療研調査 (暫定中間結果) よりも耐性率が高い傾向が示された。これは、定点観測対象となって

いる病院が主要な結核診療施設であるため、耐性結核患者が集約している可能性があることと、療研調査ではそれ以外の施設が多く含まれること、さらに感染症法の規定上多剤耐性結核菌の輸送が困難であることから、分与されなかった株があると思われ、療研の2007年調査が過小評価傾向であることも考えられた。最終評価には療研調査の結果を待たなければならない。

E. 結論

抗酸菌検査外部精度評価のための方法として、人工痰による塗抹検査パネルの作製と評価を実施し、随時利用可能な高精度のパネル検体作製技術を確立した。また培養にも利用可能な第二世代人工痰の開発も実施し、ポリアクリルアミド基質とほぼ同等の検体を作製する技術を確立した。

薬剤感受性検査については、実際に使用する検体数の条件や評価方法について検討し、INH、RFP、SM及びEBに関する判定一致率がそれぞれ90%以上とする具体的な評価(合格)基準を作成した。

定点観測システムは、検査精度が先に保証されている点では有利であるが、利用可能な他の耐性データと比較しても高率な傾向があることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

本研究においては、薬剤感受性パネルテスト用の結核菌を準備する段階において、特に耐性菌を含む感染の危険がある。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レベルの実験室で行った。

G. 研究発表

学会発表

1. 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
2. 御手洗聡：わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証 ワークショップⅡ 抗酸菌検査法。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日
3. 大角晃弘, 高橋智恵子, 御手洗聡：抗酸菌情報の流れと抗酸菌検査、保存、輸送の状況に関する日本とイングランドの比較検討。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日
4. 山田博之, 御手洗聡, 松本宏子, 藤木明子：ポリアクリルアミド、培養細胞、培養抗酸菌を用いた人工痰の長期安定性。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日
5. 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
6. 阿部千代治, 小林郁夫, 御手洗聡, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 尾形英雄：BACTEC MGIT 960 AST でイソニアジド耐性・小川法で感受性結核菌の性状。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日
7. 御手洗聡, 大友幸二, 山田博之：結核菌薬剤感受性検査外部精度評価；2003～2005年での実施経験について。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日

8. 御手洗聡. 日本における薬剤耐性結核の現状と課題. 第28回衛生微生物技術協議会研究会 岡山 2007年7月6日
9. 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.
10. Mitarai S. Minimum required quality assurance in TB culture; Issues involved in culture implementation. 38th World conference on IUATLD. Cape Town, South Africa 2007.
11. 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.
12. 御手洗聡: 結核菌サーベイランス体制の構築 低蔓延に向けた結核対策のあり方 (シンポジウム). 第83回日本結核病学会総会 東京 2008年4月24,25日
13. 御手洗聡. 抗酸菌検査精度保証の面から見たシステム構築. 第29回衛生微生物技術協議会 東京 2008年6月24,25日
14. Mitarai S. Drug-resistant TB in Japan. Taiwan-Japan Symposium on TB and International Collaboration. Taipei, September 11-13, 2008.
15. 御手洗聡. 抗酸菌感染症の効率的診断. 第55回日本臨床検査医学会学術集会 名古屋 2008年11月29,30日
2. 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: パクテック 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: 155-164.
3. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide surveillance in 2002. Int J Tuber Lung Dis 2007; 11: 1129-1135.
4. Shishido Y, Mitarai S, Otomo K, Seki M, Sato A, Yano I, Koyama A and Hattori T. Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo strain. Int J Tuber Lung Dis 2007; 11: 1334-1338.
5. 山田博之, 松本宏子, 御手洗聡, 藤木明子. ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存性と塗抹鏡検所見の再現性. 結核 2008; 83: 65-71.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

<研究協力者>

山田博之・水野和重・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
細菌検査科
藤木明子

論文発表

1. 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

結核予防会結核研究所研究部

松本宏子

結核予防会本部国際部

正木孝幸

社団法人化学及び血清療法研究所品質管理部

臨床検査センター

師岡津代子

独立行政法人国立病院機構福岡東病院検査科

木村由美子

独立行政法人国立病院機構長崎神経医療セン

ター検査科

山口 彰

国立病院機構熊本南病院研究検査科

松田惇一

長崎大学医学部附属病院中央検査部細菌検査

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究分担報告書

耐性結核予防のための保健所・主治医連絡システム、患者支援システムの策定

研究分担者：

森 亨 国立感染症研究所ハンセン病研究センター・センター長

研究要旨

薬剤耐性結核の予防は DOTS の基本的な使命の一つである。これに基づいて日本では感染症法による主治医（入院・外来医療機関）と保健所の連携を基礎にした患者支援方式としての「日本版 DOTS」が国の結核治療方式の重要な要素となっている。その実践の普及と質的向上をはかり、そのための支援技術を開発することが本分担課題の目的である。研究の概要は以下の通り。

1) 日本における DOTS 普及の評価と結核医療の質の分析

DOTS が国の結核対策特別促進事業で採り上げられて以来、全国の多くの保健所がこれを採り上げ、徐々に普及しており、またこれに伴って治療の質（標準的治療方式の採用）の改善しつつある。

2) DOTS 支援のためのツールの開発と応用

以前に研究者が開発した DOTS 対象患者の治療経過や問題事項を管理するソフトである「服薬支援システム」が多くの都道府県で試用され、その有用性が確認された。更にこれを改選した「結核看護システム」は保健所のみでなく医療機関においても試用できるもので、文字通り医療機関と保健所の連携を具体的に可能にしたものである。これの試行のいくつかの都道府県で行われ、DOTS の評価やコホート検討会に有用性を発揮している。

3) DOTS 拡大と向上のための調査・検討会

このシステムの開発・試行にあわせて関連の調査（従事者の意識、登録者の治療終了後の予後、外国人患者の支援のあり方の検討など）を行った。

研究協力者

小林典子（結核予防会結核研究所対策支援部長）

永田容子（結核予防会結核研究所対策支援部保健看護学科長）

山内祐子（結核予防会結核研究所研究部総括主任）

療法剤を規則的に完遂することであり、そのための DOTS は世界標準の治療方式である。この考え方に則り、日本では感染症法によって、主治医（入院・外来医療機関）と保健所の連携を基礎にした患者支援方式としての日本版 DOTS が国の結核治療方式の重要な要素となっている。本研究では DOTS 日本版の普及・向上を評価し、DOTS 支援のためのツールを開発し、現場で試用を行い、治療支援体制向上への提案を行う

A. 研究目的

薬剤耐性発生の防止の基礎は強力な化学

ことを目的とする。

B. 研究方法

1) 1998年(一部2000年)から2005年の結核発生動向調査年報データベースおよびその出力を用いて、DOTS日本版関連指標の全国及び都道府県政令指定都市別の値の動向を観察する。

2) DOTS日本版実践のためのツールとして『服薬支援看護システム』、さらにその改訂版である「結核看護システム」を試行し、それからの出力の吟味を行う。

3) 上記ツールの試用者による服薬支援看護ワークショップを開催し、ツールに関する討論および日本版DOTSに関する検討を行う。

4) 医療機関のDOTS職員による看護連携会議(DOTSカンファレンス)を開催し、とくに通院中の外国人結核患者の中断防止策について検討する。

5) 地域DOTSガイドライン策定の準備を行う。

6) 18都道府県市75保健所の平成14~18年登録コホートについて治療終了後の再発の予後について主として再発(再登録)の頻度を観察した。

7) 日本版DOTS担当の医療職員のDOTSに関する意識調査を実施した。

8) 参加県市および代表者(外部研究協力者)は以下のとおりであった。

加瀬林和恵(茨城県)、高野智子(熊本県)、竹島ゆり(石川県)、松村幸代(石川県)、杉原孝子(愛知県)、土屋厚子(静岡県)、梅藤薫(静岡県)、朝倉陽子(同)、和田圭司(和歌山県)、有本千佐(和歌山市)、比

嘉あゆみ(沖縄県)、土井やすみ(横浜市)、御子柴朋子(横浜市)、黒木美弥(船橋市)、田中賀子(神戸市)、宮地千世(岡山市)、堤理江(岡山市)、浦野真紀子(東京都多摩立川保健所)、高橋栄美(宇都宮市)、一色ミユキ(栃木県)、高橋恵子(同)、横井敏之(群馬県)、近野睦子(山形県)、永沢愛(山形県)、樋口倫子(堺市)、石栗理絵(東京都台東保健所)、阿部貴子(岩手県)、石田賀聖(同)、高橋愛(同)、吉田陽子(大分県)、渡辺芳子(板橋区)、安守亜樹(板橋区)、古島大資(埼玉県)、小林智春(東京都足立区)、阿蘇由比(東京都多摩立川保健所)、島村珠枝(東京大学大学院)、森由紀子(国立病院機構熊本南病院)、大谷久美子(国立病院機構和歌山病院)、亀井美幸(国立病院機構山形病院)、古川ひさみ(近畿中央胸部疾患センター)、大田屋道子(米国カリフォルニア州ロサンゼルス郡クリニック)

〔倫理面の配慮〕

結核登録者や医療機関への介入、個人情報への扱いについては、研究遂行の上で、日常業務の範囲を超える過程は発生しないが、細心の注意を払った。

C. 研究成果

1) DOTS日本版の普及とその質の状況

①登録患者の治療経過情報の把握からみたDOTS普及

保健所に登録されている患者の内80%以上の患者についてコホート情報が電算システムに入力されている保健所はDOTS条件を一つ充足している、と仮定する(DOTS保健所)。日本の人口中のDOTS保健所管内在住の割合は2000年の35.3%から始まって

2005年の83.4%へ、及び単純に全国の患者中コホート情報の把握されている者の割合も同様に38.4%から85.6%へとともに漸次上昇した。

②結核診断の精度

治療を始める人の何割が細菌学的に証明された肺結核の割合は1998年54.7%から2005年の72.1%へ、また再登録例では1999年の54.3%から2005年の73.3%へと確実にあがってきた。ただし再治療では菌陽性率は2005年でもなおかつ50%以下の人についてしか菌が証明されていない、というような所道府県もかなりある。

③治療の質—薬剤方式と治療期間

治療の質として初回治療塗抹陽性患者に標準治療方式であるPZAを含む処方治療されている割合は1998年48.7%から63.3%へと上昇した。平均治療期間については、かつては平均14.4か月だったがいまは10.2か月になった。治療が標準化されつつある。

④治療成績のコホート分析

治療成績（コホート分析の成績）を、患者のコホート情報がよく（100%）把握されている都道府県10と、40%以下しか把握されていない8県市について比較した。コホート情報把握の高い県市（患者総数1268人）、低い県市（同957人）について治療成績を比較すると治癒は56.30%対43.00%、治療完了は20.60%対38.90%、その他は1.30%対4.30%、死亡は17.50%対6.50%、治療失敗は2.50%対7.20%、そして脱落中断は1.90%対0.20%である。両者間で最も違うのは死亡率の把握、ついで中断・脱落である。コホート情報の把握が低いところは治療成績について誤った楽観的を持ちやすいことが知られる。またこのような不正確な

情報が混在する全国合算のコホート成績は現状ではあまり意味がない。

2)『服薬支援看護システム』の試行と検討

① DOTSのために患者ツールとしての「服薬支援システム」18年度は合計18自治体63保健所で、19年度は15自治体53保健所で、次期「結核看護システム」は20年度に9自治体21保健所で試行された。

② 「結核看護システム」についてその概要を以下に記す。本システムは保健所・医療機関の双方がそれぞれのモードに切り替えて独立に使用でき、必要に応じて相互の情報の交換が可能なシステムである。ひとりの患者の治療経過を入院中・外来治療中を通し一画面で一貫して捉えることができるようになっている。

【入力】治療開始時期から月毎の「菌検査情報」、「使用抗結核薬」、「副作用」、「服薬確認情報」および「DOTSタイプ」を入力していく。【出力】コホート検討会資料やDOTSカンファレンス資料等の個人票や、患者分類コード別・初服薬情報別・服薬情報割合別コホート観察の3種類の集計表とそれにあわせた図表が出力される。【コホート観察】1. 全登録者一律の従来有病状・治療内容による6ヶ月・9ヶ月判定、2. 治療が6ヶ月・9ヶ月の判定期間の範囲内では終了せずに長期におよぶ場合や、「1」の結果が失敗・中断で再治療や延長して治療がなされる場合に、個々の状況に応じた新たな判定、3. 個別の理由で別の結果が妥当と思われる場合に、直接結果をリストより選択して入力する、以上必要に応じて3種類用意されている。

- ③ 治療成績1)：「服薬支援看護システム」に DOTS 情報を入力した保健所の平成 14 年 1 月 1 日～17 年 12 月 31 日の新登録者総数 7,120 人に対して、登録時総合患者分類コード別のコホート観察結果は肺結核活動性総数 5499 人では、「治癒」38.4%、「治療完了」27.3%、「その他」14.3%、以上を合計して「治療成功」80%、そのほかは「死亡」12.9%、「治療失敗」2.3%、「脱落中断」2.0%、「不明」2.8%であった。「治療中断」はその他の結核菌陽性で 4.2%、「菌陰性・その他」で 2.3%であった。また、マル初では 3.4%であった。
- ④ 治療成績2)：「結核看護システム」に DOTS 情報を入力した対象者は、喀痰塗抹陽性者のみ、肺結核患者のみ、肺外結核・潜在性結核感染症まですべて、また外国人患者のみを対象として入力しているなど保健所のニーズにあわせて様々であった。現在報告されている登録者のうち平成 19 年コホート肺結核患者 568 人の結果は、治療成功 (80.8%：治癒 44.9、治療完了 21.8、その他 14.1)、死亡 (14.3%：結核 6.2、結核外 8.1)、治療失敗 (2.5%)、脱落中断 (0.5%)、不明 (1.9%) であった。判定期間後継続治療をおこなったケースは、治療失敗となり継続治療をおこない治癒した 2 例を含めて 13 件で、肺結核患者 568 人全体でみると治療成功率は 81.3%と上昇した。入力項目で見ると治療成功率が最も低いのは、職業では「無職・その他」71.2%、性別は「男」80.2%、年齢は「80 歳以上」65.8% (死亡が多いため)、リスク評価は「過去の中断歴」42.9%、合

併症は「腎障害」44.4%であった。DOTS タイプ「入院中：院内 DOTS+外来治療中：地域 DOTS」の割合について見ると、初回の服薬情報では 91.7%、判定期間内の 2/3 以上しめている割合は 68.3%であった。

- ⑤ 支援の状況：分析対象は、平成 14 年 1 月 1 日～17 年 12 月 31 日までの新登録で「肺結核喀痰塗抹陽性初回治療・再治療、その他の結核菌陽性」総数 4,455 人に関して初回服薬情報をみると、治療開始当初は「本人への面接」は 58.5%、「本人・面接以外」は 5.3%、「本人以外・面接」は 7.3%であった。治療開始当初の 1 ヶ月について、「DOTS タイプ」は、入院中「院内 DOTS」が 14 年 36.8%から 16 年 72.1%と増加、17 年は 67.6%であった。17 年「地域 DOTS はおこなわれていない」は減少した。「院内 DOTS +地域 DOTS」の割合は 14 年 20.9%から 17 年 56.5%へと増えた。
- ⑥ 出力の活用：「コホート検討会資料 (個別の患者治療経過情報一覧)」をコホート検討会で利用した。本システムを試用していない県市でも同様の資料が活用できるよう、エクセルで検討会様式を作成した。平成 18 年は保健看護学科研修において、この「コホート検討会」様式を用いた演習を行った。

3) 医療機関外来と保健所との外来看護連携の試み

退院患者の外来での治療中断の把握のために、結核予防会第一健康相談所において、日本人患者に比べ治療中断率が高い外国人患者を対象に看護連携会を試行した。毎年奇数月に 5 回実施した。事例を通して、日

本語学校との連携のあり方、経済的な問題や言葉（日本語）の問題への対応、服薬中断（飲み忘れ）時期などを協議し検討を重ねた結果、患者支援の保健所間格差を是正することができ、医療機関と保健所の連携強化につながった。言語の問題が大きい事から、結核の基礎知識と服薬手帳を合体させた小冊子「結核でも心配しないで!？」を10カ国語に翻訳し活用した。さらに、理解を深める方法として映像版CDを作成した。

平成18年（2006年）4月から平成19年（2007年）6月までに治療を開始していた外国人結核患者66例の治療成績は、治療成功（治癒+完了）59例（89.4%）、中断6例（9.1%）、帰国1例（1.5%）であった。中断の理由は「治療が長い（2ヵ月目、4ヵ月目）」、「妊娠」、「住居が転々とかわる」「3ヵ月後蕁麻疹」などであり、1例は全く連絡がつかなかった。4例はカンファレンスで対応方法を検討した結果、治療を再開し終了できた。

病型はII型が3名、他全員がIII型、標準治療で開始している。発見方法は学校健診・職場健診・接触者健診がほとんどを占めており、自覚症状もなく軽症である。性別は男39例・女27例、年齢は20代が76.6%を占めていた。国籍別では中国と韓国をあわせて63.6%、他にミャンマー、ベトナム、モンゴル、タイ、スリランカ、台湾などアジアの国々が97%、職業では学生（日本語学校、専門学校、大学）が86.4%であった。参加保健所は、東京都および特別区、神奈川県、千葉県、群馬県、埼玉県などの近隣県市保健所であった。

DOTSカンファレンス開始前の治療成績によると外国人患者の治療中断率は

14.2%(20例/141例)であり、その後のフォローで治療終了できたのは15%(3例/20例)であった。中断率を比較してみると、DOTSカンファレンス開始後は5%減少し改善が見られた。生活や就労が不安定な場合、未受診後の経過期間が長いほど患者への連絡が困難となる。特にDOTSカンファレンスで「住居を転々とし電話番号の変更で連絡が取れない」「飲み忘れ」「受診が遅れた」など様々な事例を参加者全員で共有することが対応策のヒントにつながっている。参加者で、服薬が継続されていても治療継続を阻む何らかの要因を把握した段階で早期の対応が必要であることを再認識した。

外来DOTSカンファレンスの試行を通し、保健所・診療所双方で服薬支援や治療に関する情報を共有することによって、保健所間の外国人結核患者の対応の差が是正され、中断防止や早期対応につながった。課題をまとめると、治療継続を阻む要因が複数あることへの理解、薬局や日本語学校など関係機関との連携、外来DOTSカンファレンスの必要性、言語理解に対する早期対応、軽症・非感染性患者への支援の必要性などである。入院を要しない外来患者に対して地域DOTSでの患者支援は関係機関と保健所間のお互いの協働が今後ますます重要である。中断防止の観点から、対象を外国人患者だけでなく、日本人の若年患者を中心としたすべての患者へ拡大していく必要があると考える。

4) 地域DOTSワークショップの開催

DOTS普及や質の問題を明らかにし、入院・外来DOTSの経験を分析・検討するため、全国から43名の保健師・看護師が集まり、その知見に基づき「日本版地域DOTS

ガイドライン」の策定を進めた。

5) 治療終了者の予後

本システムの先行システムである「服薬支援システム」に平成14～18年(県市によって多少差異がある)の間に搭載された患者合計2964人の治療終了後の状況を追跡した。現在集計解析の途上であるが、概況で見ると、治療成績で「治癒」、「治療完了」とされた者のその後の再発はそれぞれ0.9%、0.8%に見られ、「治療失敗」の者の再発は1.8%と、明らかに高かった。

6) DOTS 事業従事者の意見調査

全国結核対策推進会議に参加した行政機関と医療機関に属する者への日本版 DOTS の関係機関連携に関する意見調査をおこなったところ、現在9割近くの保健所と結核専門病院が連携して日本版 DOTS に基づいた患者支援が進められ、今後患者の生活スタイルにあわせた地域 DOTS を展開するために、行政機関は訪問看護ステーションや調剤薬局等地域の様々な機関との連携を考えていることが明らかになった。また、日本版 DOTS の重要な要素である DOTS カンファレンスとコホート検討会が着実に DOTS 事業に導入されていること、治療開始から終了まで一貫した診療方針のもとで患者を支援するツールとしての地域連携パスの早期導入が示唆された。

次に平成17年から19年度の結核研究所研修を受講した983名(看護師319名、保健師664名)に対してDOTS事業や研修に関する意見や意識を調査した。看護師と保健師の結核業務年数は5年未満21.4%・22.8%、5～9年18.6%・28.0%、10～14年11.9%・12.5%、15年～19年12.4%・14.4%、20年以上28.6%・19.1%。方法：研修では

結核の基礎知識と共に、DOTS事業の実際や事例演習、グループ討議を取り入れ、最終日に研修前と研修後のDOTSに対する意識の変化について、自記入式アンケート調査を実施した。【結果】研修後DOTSに対する意識が変わったと答えたのは、看護師78.7%、保健師87.2%であった。研修前と研修後のDOTSのイメージは次の通りである。

[研修前] 看護師：「ただ薬を飲んでもらう、ただ目の前で飲ませることで終わっていた」「服薬確認の方法だけにとらわれていた」「地域DOTSにつなげるという視点がなかった」保健師：「飲んでいるか飲んでいないかということばかりいっていた」「たぶん大丈夫という気持ちがあった」「きっと飲んでいるだろうと思込んでしまっていた」「何度も確認するのは患者を信頼していないようで嫌だった」[研修後]「治療完遂までの支援であることを考え直す機会になった」「必要だから、もっと工夫してやってみようという考えが変わった」「患者が主体だということに気付かされた」。患者の服薬支援に当たる看護師や保健師の研修を通してDOTSに対する意識が変わったと答えた割合は、例年ほぼ同じであった。DOTSによる服薬確認が常業務化し、スタッフが交代する中で、「結核患者の確実な治癒」というDOTSの原点が忘れられている状況が自由記載の意見の中に伺われた。動機付けすべきは治療提供者側であることから、恒常的なスタッフ教育の必要性が示唆された。アドボカシーとして、引き続きDOTS拡大に向けた当研修の強化に努めたい。

7) ロサンゼルス郡のDOT体制および結核看護の視察

「日本版地域 DOTS ガイドライン」の策定を考え、1)地域 DOTS の目的、2)推進の基本姿勢、3)医療機関と保健所の連携、4)実際、5)行政の責務・評価を検討した。ロサンゼルス市の結核対策の視察（平成 19 年 4 月 16 日～21 日）を通し、このガイドラインに日本オリジナルの地域連携パスの導入が示唆された。

8) 服薬支援看護ワークショップでの検討
コホート検討会はすべての自治体で開催され、また診査会の場の活用も見られた。服薬支援を評価するシステムである、入力することで DOTS 実施につながり保健師の意識が高まった、服薬支援の視点明確となり支援の質が向上したなどの声が担当者より聞かれた。集計結果については 1 年間の客観的評価に用いる等、服薬支援や保健師活動の評価などに活用しているとの声が聞かれた。医療機関との連携においては限られた結核専門病院で良好な連携が構築されている。今後においては医療機関と共通の視点で質の高い服薬支援が行えるような取り組みについて討議を行った。

9) 「日本版地域 DOTS ガイドライン」の策定を考え、1)地域 DOTS の目的、2)推進の基本姿勢、3)医療機関と保健所の連携、4)実際、5)行政の責務・評価を検討した。この基本構想の下に、策定作業は結核病学会保健看護委員会に引きつがれている。

10) 「結核看護システム」の定着とよりよい活用を広い確度から図るため、システム利用者の相互研鑽と情報交換を目的としたフォーラム（メーリングリスト）を結成した。

D. 考察

DOTS 日本版が提唱されて以来 8 年、徐々にではあるが基本的な要素は確実に全国に浸透しつつあると考えられる。この普及を側面から支えるべく我々が行ってきたツールを通しての推進活動も着実に成果を上げ、上記の望ましい傾向を支えてきたと考えられる。

ただし、昨今問題になる「医療崩壊」のなかで日本の結核医療をとりまく条件はきびしいものがある。DOTS 日本版の成否もまさにこの問題への対応にかかっていると見える。DOTS を行う医療機関への経済的インセンティブ（診療報酬）はその端的な要因であろう。ツールとは対極にあるこのようなマクロの問題を同時に考えていく必要がある。

また治療成績の向上という DOTS 事業の目的を考えると、多剤耐性結核治療、つまりかつて DOTS-Plus と呼んでいた（近年は「プログラム化された治療管理」）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。

E. 結論

日本版 DOTS は着実に拡大してきており、その内容も充実して来つつある。これに呼応して結核医療の水準も向上していると考えられる。しかしまだ十分な水準までは達しておらず、一方で深刻化する悪化要因を今後克服していけるとは言い難い。今後は従事者の能力の向上を図りつつ、患者支援を地道にシステムと技術面で進めていくとともに、結核医療危機の打開に向けた努力を続ける必要がある。