

添付書類 1 : アンケート調査表

アンケート：結核患者に対する HIV 検査実施および検査結果情報収集の現状

質問は次の紙から始まります。あなたの役職から A、B いずれかをお選びなり、指示に従ってお進みください。

A. 保健師の方： ページ1-4の質問にご回答ください。
(保健所にお勤めの、保健師以外の方も、Aをお選びください。)

B. 看護師の方： ページ5-8の質問にご回答ください。

A. 保健師の方への質問 (ページ1-4)

1. あなたは、HIV/AIDSと結核について、以下の内容を知っていますか？

1-1. HIV陽性は結核発症のリスク因子である。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-2. HIV陽性の結核患者では、塗抹陰性患者や肺外結核患者の割合が増加する。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-3. 結核治療開始後に、抗HIV治療 (HAART) を併用すると、免疫再構築症候群が生じることがある。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-4. HAARTの導入により、HIV/AIDS患者の生命予後は劇的に改善された。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-5. HAARTは、現時点では、一度治療を開始すると、一生継続する必要がある。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-6. 以上の知識はどのような機会に得ましたか？ (複数回答可)

- a. 学校の講義で
- b. 講演会、研修等を通じて
- c. 業務を通じて
- d. 業務以外の自己学習で
- e. その他

()

2.あなたの施設では、市民への HIV/AIDS 相談事業として、匿名での HIV 検査の提供以外に、どのようなことを行っていますか？ (複数回答可)

- a. 医療機関の紹介
- b. 電話相談
- c. HIV/AIDS 検査普及週間の開催
- d. 保健所内の HIV/AIDS 情報展示
- e. インターネット上の HIV/AIDS 情報展示
- e. 地域の各種企業・団体 (青年会、老人会、商工会、農業団体など) に対し、HIV/AIDS に関する知識普及活動 (研修会など含む)
- f. 学校教育・学校活動との連携
- g. 民間ボランティア団体との連携
- h. ピア・エデュケーション (感性や価値観の近いピア・エデュケーターが伝え話し合う手法)
- i. その他

()

以下（質問3から10）は、結核と診断された患者さんに対する HIV/AIDS 検査・相談に関する質問です。

3-1. あなたは、結核患者さんとの面接や保健教育において、HIV/AIDS の話をしますか？（複数回答可）

- a. 全ての結核患者さんを対象に話をする
- b. 結核患者さんの年齢層を選んで話をする
- c. HIV 感染のリスクがあると思われる結核患者さんに話をする
- d. 特別に分けて話はしないが、患者教育のパンフレットなどに含まれているので、それを示す。
- e. HIV/AIDS のことにはほとんど触れない
- f. HIV/AIDS のことには全く触れない
- g. その他

[]

3-2. 3-1 で「a.」「b.」「c.」を選ばれた場合、
どのような話をされますか？

[]

4. あなたはこれまでに、結核でかつ HIV 陽性である患者さんの対応をされた経験がありますか？

- a. はい
- b. いいえ

5. あなたは、結核と診断された患者さんの、スクリーニング目的の HIV 検査は、どこで行われるのが適切だと思いますか？

- a. 保健所
- b. 結核治療を行っている医療機関
- c. その他 ()
- d. わからない

6-1. あなたはこれまでに、結核と診断された患者さんに、スクリーニング目的の HIV 検査を勧めたことがありますか？

- a. はい
- b. いいえ

6-2. 6-1 で「a.はい」の場合、HIV 検査を勧めた理由は何ですか？（複数回答可）

- a. 施設の方針として、勧めることになっているから
- b. HIV は結核と重要な関連がある疾患だから
- c. 結核患者さんの行動に HIV 感染のリスクがあったから
- d. その他

[]

6-3. 6-2 で「e. 結核患者さん自身に HIV 感染のリスクがあったから」を選択された場合、該当するものを以下から選んでください。（複数回答可）

- a. 性的に活動的な年齢層に属した
- b. 具体的にリスクを伴う性行動があった
- c. その他

[]

6-4. 6-1で「**a.はい**」の場合、検査を勧めた結核患者さんの反応はどうでしたか？

- a. HIV 検査を受けた
- b. HIV 検査を受けなかった
- c. わからない

6-5. 6-4で「**a. HIV 検査を受けた**」の場合、そのHIV 検査はどこで行われましたか？

- a. 保健所
- b. 結核治療を行っている医療機関
- c. その他 ()

6-6. 6-4で「**b. HIV 検査を受けなかった**」の場合、どのような理由が考えられましたか？

()

7-1. 結核と診断された患者さんには HIV 抗体検査を勧める方針が、WHO から推奨されていますが、あなたは、日本にこの方針が適応されうと思いますか？

- a. はい
- b. いいえ
- c. わからない

7-2. 7-1で「**a.はい**」「**b.いいえ**」の場合、その理由は何ですか？

()

8-1. 登録された結核患者さんの情報を入手する際に、あなたは、HIV 合併の有無に関する情報はどのようにして入手していますか？（複数回答可）

- a. 医療機関からの情報
- b. 患者さん本人からの情報
- c. その他 ()

8-2. 8-1で「**a. 医療機関からの情報**」の場合、具体的な情報源をお知らせください。（複数回答可）

- (ア) 結核発生届の記載
- (イ) 後天性免疫不全症候群発生届の記載
- (ウ) 公費負担申請書の記載
- (エ) 死亡届の記載
- (オ) カルテの記載
- (カ) 担当医の意見書
- (キ) 担当医から直接連絡あり
- (ク) その他 ()

9. あなたは、現在の『結核登録者情報システム』では、HIV 合併の有無の項目があることをご存知ですか？

- a. はい
- b. いいえ
- c. わからない

10. 結核患者さんへの HIV 検査、HIV 合併結核患者さんの結核治療と結核治療終了後の HIV 治療に関して、保健所や医療機関が取り組むべき課題など、あなたのご意見を自由にお聞かせください。

10-1. 結核患者さんへの HIV 検査



10-2. HIV 合併結核患者さんへの結核治療



10-3. HIV 合併結核患者さんの結核治療終了後の、
HIV 治療と療養支援



B. 看護師の方への質問 (ページ5-8)

1. あなたは、HIV/AIDSと結核について、以下の内容を知っていますか？

1-1. HIV陽性は結核発症のリスク因子である。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-2. HIV陽性の結核患者では、塗抹陰性患者や肺外結核患者の割合が増加する。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-3. 結核治療開始後に、抗HIV治療(HAART)を併用すると、免疫再構築症候群が生じることがある。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-4. HAARTの導入により、HIV/AIDS患者の生命予後は劇的に改善された。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-5. HAARTは、現時点では、一度治療を開始すると、一生継続する必要がある。

- a. 知っていた
- b. 知らなかった

1-6. 以上の知識はどのような機会に得ましたか？

(複数回答可)

- a. 学校の講義で
- b. 講演会、研修等を通じて
- c. 業務を通じて
- d. 業務以外の自己学習で
- e. その他

[]

以下（質問 2 から 9）は、結核と診断された患者さんに対する HIV/AIDS 検査・相談に関する質問です。

2-1. あなたは、入院された結核患者さんからのアナムネ聴取時、もしくは患者教育の場面において、HIV/AIDS の話をしますか？（複数回答可）

- a. 全ての結核患者さんを対象に話をする
- b. 結核患者さんの年齢層を選んで話をする
- c. HIV 感染のリスクがあると思われる結核患者さんに話をする
- d. 特別に分けて話はしないが、患者教育のパンフレットなどに含まれているので、それを示す。
- e. HIV/AIDS のことにはほとんど触れない
- f. HIV/AIDS のことには全く触れない
- g. その他

[]

2-2. 2-1 で「a.」「b.」「c.」を選ばれた場合、どのような話をされますか？

[]

3. あなたはこれまでに、結核でかつ HIV 陽性である患者さんの看護をされた経験がありますか？

- a. はい
- b. いいえ

4. あなたは、結核と診断された患者さんの、スクリーニング目的の HIV 検査は、どこで行われるのが適切だと思いますか？

- a. 結核治療を行っている医療機関
- b. 保健所
- c. その他
()
- d. わからない

5-1. あなたが勤務されている病院、もしくは病棟では、結核と診断された患者さんに、HIV 検査を勧めていますか？

- a. はい
- b. いいえ

5-2. 5-1 で「a.はい」の場合、どのような結核患者さんを対象に検査を勧めていますか？（複数回答可）

- a. 全ての結核患者さんを対象に検査を勧める
- b. 入院結核患者さんにのみ検査を勧める
- c. 入院結核患者さんの中で、HIV 感染のリスクがあると思われる結核患者さんにのみ検査を勧める
- d. その他

5-3. 5-1 で「a.はい」の場合、以下のどの職種の方が HIV 検査を勧めていますか？（複数回答可）

- a. 主治医・担当医
- b. 看護師
- c. カウンセラー
- d. 担当保健師
- e. その他

[]

5-4. あなたご自身は、これまでに、結核患者さんに、スクリーニング目的の HIV 検査を勧めたことがありますか？

- a. はい
- b. いいえ

5-5. 5-4 で「a.はい」の場合、検査を勧めた結核患者さんの反応はどうでしたか？

- a. HIV 検査を受けた
- b. HIV 検査を受けなかった
- c. わからない

5-6. 5-5 で「a. HIV 検査を受けた」の場合、その HIV 検査はどこで行われましたか？

- a. 貴施設（病院内、病棟内）
- b. その他
()

5-7. 5-6 で「b. HIV 検査を受けなかった」の場合、どのような理由が考えられましたか？

()

6-1. 結核と診断された患者さんには HIV 抗体検査を勧める方針が、WHO から推奨されていますが、あなたは、日本にこの方針が適応されうと思いますか？

- a. はい
- b. いいえ
- c. わからない

6-2. 6-1 で「a.はい」「b.いいえ」の場合、その理由は何ですか？

()

7.保健師さんが、結核患者さんの情報入手のためにあなたの施設を訪れた際、HIV 合併の有無に関する情報はどのように提供していますか？（複数回答可）


- a. 患者さんご本人からの提供
- b. 主治医・担当医からの提供
- c. 看護師からの提供
- d. カルテ記載およびカルテ内の関連書類からの提供
- e. その他
()
- f. わからない

8. あなたは、現在の『結核登録者情報システム』では、HIV 合併の有無の項目があることをご存知ですか？

- a. はい
- b. いいえ
- c. わからない

9. 結核患者さんへの HIV 検査、HIV 合併結核患者さんの結核治療と結核治療終了後の HIV 治療に関して、医療機関や保健所が取り組むべき課題など、あなたのご意見を自由にお聞かせください。

9-1. 結核患者さんへの HIV 検査



9-2. HIV 合併結核患者さんへの結核治療



9-3. HIV 合併結核患者さんの結核治療終了後の、HIV 治療と療養支援



10. 最後に、あなた自身の情報をお知らせください。

10-1. 性別

- a. 女性
- b. 男性

10-2. 年齢

- a. 20 歳代
- b. 30 歳代
- c. 40 歳代
- d. 50 歳以上

10-3. 看護師登録後の年数

- a. 10 年未満
- b. 10 年以上 20 年未満
- c. 20 年以上 30 年未満
- d. 30 年以上
- g. わからない

10-4. 職種

- a. 管理職
- b. それ以外

10-5. 勤務する病棟もしくは施設区分

- a. 結核病棟
- b. 感染症病棟
- c. 一般病棟（結核モデル病床あり）
- d. 一般病棟（結核モデル病床なし）
- e. その他
()

10-6. 現在の病棟でのご勤続年数

- a. 1 年未満
- b. 1 年から 2 年
- c. 3 年以上

10-7.

この質問表に記載していただいた情報は、日本における HIV/AIDS 合併結核の調査に結果を反映させていただく場合があります。情報は無記名で、回答者を同定しないものとして扱われます。

あなたはそのことに同意いただけますか？

- a. 同意する
- b. 同意しない

お忙しい中ご協力をありがとうございました。

結核研究所

村上邦仁子、河津里沙、星野斉之、永田容子、山田紀男、加藤誠也



エイズ合併結核に関するフォーカス・グループ・ディスカッション

対象 : 保健師/看護師

人数 : 5 人程度

時間 : 40-50 分

Part 1. エイズ合併結核について

1. 世界ではおよそ 4000 万人いる HIV 陽性者及びエイズ患者の約 3 分の 1 が同時に結核に感染していると言われていますが、日本におけるおよそのエイズ合併結核の症例数をご存知ですか？皆さんの中で、エイズ合併結核の患者さんを身近で経験なさったことがある、あるいは県の中で話題になったことがある、という方はいらっしゃいますか？平成 20 年度のエイズ発生動向年報によると、日本国籍のエイズ患者累計 (3886) に占める指標疾患の分布をみると、活動性結核は 6.8%、外国籍のエイズ患者類型 (1013) に占める活動性結核は 14.6%と報告されています。また、1992 年から 2002 年までの間にエイズ拠点病院及び国立療養所 (現 : 国立病院機構) にて経験されたエイズ合併結核症例は 168 例という報告があります (佐々木結花、2006)
2. また、2009 年の WHO の報告書によると、日本における成人結核患者中の抗 HIV 陽性率は 0.5%という数字に留まっています。例えばイギリスは 3.3 %、アメリカは 12%、カナダは 5.7%と、他の先進国に比べると、日本の数字は未だ未だ低いと感じられると思います。そこで皆さんにお聞きしますが、エイズ合併結核の症例数が日本では低いのはなぜだと思われませんか。(あるいは、報告されている数字は・・・実際よりはもっと低い?)
3. 今後はどうなると思いますか？増えていく - なぜそう思いますか？どのような人たちから増えていくと思いますか？変わらない・減っていく - なぜそう思いますか？

Part 2. エイズ結核対策について

1. WHO が提唱する TB/HIV collaborative activity (連携活動) というのは聞いたことありますか？
フリップを見せて説明
2. このほかに日本・自治体ではどのような対策が必要・適切だと思いますか？あるいは必要になってくると思いますか？

Part 3. 結核患者に対する HIV 抗体検査について

1. イギリスやアメリカでは結核患者さんに対して積極的に HIV 抗体検査を実施していますが、日本・自治体では必要だと思いますか？なぜ必要だと思いますか。なぜ必要ではないと思いますか。

2. (リスクの高い患者さんには必要) - 「リスク」をどのような基準で判断するべきだと思いますか。
3. その判断は誰がするべきだと思いますか。
4. 「VCT」とは何を意味するかご存知ですか？
フリップを見せて説明。簡単に言えば、人々が自らの判断で自発的に検査やカウンセリングを利用すること、利用することが可能な環境作りのこと、を指しています。
例えば安全な輸血対策としての、あるいは集団の陽性率を知るためだけのスクリーニング的な HIV 検査ではしばしば本人に結果が還元されず、感染者の治療に結びつけられないことが問題となっていたのですが、VCT ではカウンセリングと検査を日和見感染の治療や更なる感染の防止をも目的とする介入の機会として捉えています。
5. 「PITC」は聞いたことはありますか？
2、3 年前ほどから HIV 検査については方針の見直しが国際的な議論になっています。というのも本人の自発的意思を重視しすぎて、検査数・感染者同定があまり多くできていないのが現状だからです。そこで WHO と UNAIDS は 2007 年には HIV 検査に関するガイドラインを見直し、VCT の普及を進めると同時に、新たなアプローチが必要であるとし、PICT を推奨しています。PICT とは **provider-initiated testing and counselling** の略で、すなわち医療現場で HIV 感染が疑われたら、医療スタッフ側からも積極的に HIV 検査を勧めていくという姿勢を指しています。HIV 高蔓延国においては全ての医療現場において全ての患者に対して PICT を行うことを、HIV 中蔓延国、低蔓延国においてはハイ・リスク患者、妊婦、結核患者等を対象に PICT を行うことを推奨しています。
6. そこでお聞きします。皆さんは日本での結核患者に対する VCT あるいは PITC は必要だと思いますか。その導入は現実的だと思いますか。非現実的だと思う方はどうしてそう思いますか。
7. もし導入された場合、誰がどこで実施するべきだと思いますか。それに関して、保健所はどのように関わっていくべきだと思いますか。あるいは関わっていきたいと思いますか。
8. 検査に関するガイドラインといったようなものは必要だと思いますか。(これから必要になってくるとは思いますか) ガイドラインがあれば VCT/PITC を実施しやすくなると思いますか。

エイズ結核合併症に関する
フォーカス・グループ・ディスカッション

お忙しい中、本フォーカス・グループ・ディスカッションにご協力、誠にありがとうございます。

このディスカッションは TB/HIV 連携における保健所活動の現状把握と改善への提言を目的とした調査の一環として実施しています。

このディスカッションでは主にエイズ合併結核やその対策について皆様にお話していただきたいと思っております。本調査によって得られた情報は日本における HIV/AIDS 合併結核の調査に結果の一部として反映させていただく場合があります。

留意・注意事項

- ✦ プライバシー保護のために、お答えになった回答については、研究目的以外に使用することは一切ありません。
- ✦ また、発言者の氏名が特定できるような形での報告はいたしません。

以上の点をご理解していただいたうえで、このグループ・ディスカッションの参加に同意していただけますか？

お名前	勤務先

日時 _____ 場所 結核研究所 _____

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岩本朋忠、富田元久、岡田全司、坂谷光則	遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討.	結核	84(1)	15-21	2009
Hiroki Ando, Yuji Kondo, Toshinori Suetake, Emiko Toyota, Seiya Kato, Toru Mori, and Teruo Kirikae	Identification of KatG Mutations Associated with High-Level Isoniazid Resistance in <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	<i>ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY</i>	54(5)	1793-1799	2010
H. Ando, S. Mitarai, Y. Kondo, T. Suetake, J.-I. Sekiguchi, S. Kato, T. Mori, and T. Kirikae	Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> isolates in Japan	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>		In press	2010
切替照雄	複数の薬効きにくい結核迅速判別キット(記事)	日本経済新聞	2/22		2010
和田崇之、前田伸司	北京株	保健師・看護師の結核展望	93 (前期)	86-89	2009
前田伸司、村瀬良朗	結果菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベース	結核	84(12)	784-786	2009
永井仁美	小児結核の現状と対策 ～小児結核症例検討会からみえてくるもの～	保健師・看護師の結核展望	93 (前期)	73-80	2009

IV 研究成果の刊行物・別刷(一部)

遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ⁴岩本 朋忠
²富田 元久 ¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨:〔目的〕 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA 法) のわが国における有用性の検討。〔対象〕 NHO 近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離された抗酸菌 122 株。〔方法〕 INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キット (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法, アキュプローブ法と DDH 法) との結果を比較検討した。同定不能もしくはデータ間で違う結果を示した株についてはシーケンス解析を行った。〔結果〕 122 株のうち 112 株が 3 種類の同定キットのいずれかと INNO-LiPA 法の結果が一致した (91.8%)。相違を認めた 10 株のうち 6 株は INNO-LiPA 法とシーケンス解析の結果が一致した。しかし 2 株のうち 1 株は DDH 法の結果と一致し *M. fortuitum*, もう 1 株はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法とアキュプローブ MAC 法の結果と一致し *M. intracellulare* と判定された。INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キットの結果がともにシーケンス解析結果と異なる株は 2 株認められた (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* 近縁種)。〔考察〕 INNO-LiPA 法は正確性, 迅速性に優れており有益性が証明された。培養および生化学的性状試験と併行して実施することにより総合的な抗酸菌同定が可能であると考えられた。

キーワード: 抗酸菌, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, 同定検査, 16S rRNA 遺伝子, ITS シーケンス解析

はじめに

抗酸菌同定検査において生化学的同定検査を実施するには多大な労力と菌量が必要である。また培養にかかる期間も結核菌だと小川培地で 3~8 週間は必要であり, 治療方針を決定するうえでも迅速な同定検査は必須である。近年, 遺伝子検査の手法を応用した抗酸菌の迅速同定検査が日常的に用いられるようになり, さまざまな測定原理から開発された菌同定用キットが市販されている。抗酸菌を正確かつ迅速に同定する性能を兼ね備えたこれらのキットは, 先人により高い評価と共に各種問題点も報告されている^{1)~7)}。

コバス アンプリコア マイコバクテリウム法は polymerase chain reaction (PCR) を用いて DNA を増幅後, ハイブリダイゼーションすることで臨床検体や菌株を対象

として *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* の 3 菌種が同定できる^{1)~3)}。前倉らによると肺結核患者における塗抹陽性検体の 94.4% はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法で陽性であったが, 塗抹陰性検体の場合は 70.8% が陽性となった⁴⁾。

アキュプローブ法は検体の 16S rRNA をターゲットとして, 菌種特異的 DNA プローブとハイブリダイゼーションさせてから, 専用の検出器を用いて化学発光を検出するキットである⁵⁾。結核菌群と *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae* の 4 種類のキットがあり, アキュプローブ陽性となる感度は結核菌群と *M. gordonae* で 100%, MAC 95.2%, *M. kansasii* 44.0% という報告⁵⁾や, 結核菌群 87.2%, MAC 78.6%, *M. kansasii* 91.7%, *M. gordonae* 85.9% とする報告⁶⁾などがある。

DDH 法は核酸の相同性を利用し, ハイブリダイズし

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター, ²研究検査科, ³内科, ⁴神戸市環境保健研究所

連絡先: 吉田志緒美, 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 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
 (Received 28 Aug. 2008 / Accepted 30 Oct. 2008)

たDNAの比率をビオチン-アビジン反応を用いてそれぞれの基準DNA株と被検菌DNAのDNA塩基配列の同一性を測定するキットで18菌種の同定を一度に行うことが可能である⁷⁾。同法は「全染色体DNAの類似度(similarity)が70%以上であれば、同じ菌種としてよい」という細菌分類学の菌種同定基準を利用している。そのため相対類似度で算出された数値から供試菌がどの菌種の基準株に最も近いかという結果は得られるが、同定不能となる菌種が多い傾向がある⁸⁾⁹⁾。また「肉眼的に明らかな発色が確認された場合には吸光度を測定せずにウェルの菌種と同定してもよい」としていることも誤判定を生じやすい原因である。

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法)は16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域をターゲットとしPCR法で増幅されたDNAを対象に、ラインプローブアッセイを用いて検出する。一度に15菌種の同定と*Mycobacterium*属に共通の*Mycobacterium* genusのプローブがあることから抗酸菌の確定が可能である¹⁰⁾。

INNO-LiPA法の検討はこれまでにいくつか報告はあるが^{10)~13)}、現時点でわが国における検討報告はなされていない。今回われわれはINNO-LiPA法の迅速性ならびに正確性について上記の先に市販されている同定キットの結果と比較しその有用性を検討した。

方 法

対象

独立行政法人近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離培養される菌株のうち大半を占める抗酸菌は結核菌群であるが、多くの菌種が存在し、日常検査で判定に苦慮する割合が高いのは非結核性抗酸菌 (NTM) である。今回NTMに対する同定結果の比較に重点をおき、結核菌群の菌株数を絞って検討を試みた。したがって2006年2月1日から6月30日までの期間に分離された結核菌群7株、NTM 115株の合計122株を対象とした。すべての菌株同定は同定検査結果とあわせて小川培地上でのコロニー性状の観察をもって最終判定とした。

検体内に複数の菌が混在する場合に同時に鑑別が可能かどうかを検討するため、臨床検体から複数の菌種が認められた3つの混合培養も検討に加えた。これらはあらかじめ固形培地上で異なるコロニー性状をもつと判定され、おのおの純培養を行って3種類の同定キットにて同定検査を実施、複数菌混在であることを確認した。

同定キット

NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて日常検査に使用している遺伝子を用いた同定キットを使用した。

結核菌群の同定には結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット (極東製薬工業) と結核菌群同定試薬

キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。*M. avium*と*M. intracellulare*の同定にはコバスタンプリコア マイコバクテリウム アビウムとコバスタンプリコア マイコバクテリウム イントラセルラー (コバスタンプリコア マイコバクテリウム法: ロシュ・ダイアグノスティクス)、MACの同定にはアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス (アキュプローブ MAC法: 極東製薬工業) を用いた。*M. kansasii*および*M. goodii*の同定には、研究用試薬であるアキュプローブ マイコバクテリウム カンサシとアキュプローブ マイコバクテリウム ゴルドネ (共に極東製薬工業) を用いた。上記以外の菌種の同定にはDDH マイコバクテリア '極東' (DDH法: 極東製薬工業) を用いた。すべての方法は添付の仕様説明書に準拠して行った。DDH法はDNAの精製が不十分な場合に同定不能の結果が得られることもあるため同定不能の結果が得られた場合には再検査を行った。

DNAの抽出

小川培地発育菌から白金耳で径2~3mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ lに懸濁した。56 $^{\circ}$ C、15~30分処理後10秒間 vortexし、正確に100 $^{\circ}$ C、8分間処理した後直ちに氷水中で急冷した。10秒間 vortexし、12000 rpm、3分遠心した上清をINNO-LiPA法ならびにシーケンス解析法に用いた。

INNO-LiPA法

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法: INNOGENETICS) は、発色確認用コントロールと抗酸菌特異的プローブ (MYC genus) および菌種鑑別のための22本のITS遺伝子プローブが固相化されたストリップ状のキットである。プローブは12菌種のプローブに加えて、3種類の subtypeが鑑別可能な*M. kansasii* プローブ、4種類のMAIS complex プローブ、*M. abscessus*を含んだ3種類の*M. chelonae* complex プローブが配置されている。同キットの使用説明書に準拠して16S-23S ITS領域の遺伝子のPCR増幅を行い、得られたPCR増幅産物をLiPA検体として使用した。LiPA検体をハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって抗酸菌の同定を行った (Table 1)。

INNO-LiPA法においてはPCRの後、すべてのPCR産物を電気泳動し得られたバンドから増幅の確認を行った。またDDH法と同様にMYC genusにしか発色が見られない場合、再検査を行った。

16S rRNA 遺伝子、ITS領域のシーケンス解析

3種類の同定キットとINNO-LiPA法により同定不能であった株、ならびに結果の乖離が認められた株に対し

Table 1 Interpretation of *Mycobacterium* species by using the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Line	Probe	Taxa reacting with the probe
1	Conjugate Control	
2	MYC genus	Presence of <i>Mycobacterium</i> in the test sample
3	MTB	<i>M. tuberculosis</i> complex: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i>
4	MKA-1	<i>M. kansasii</i> (group I)*
5	MKA-2	<i>M. kansasii</i> (group II)*
6	MKA-3	<i>M. kansasii</i> (group III, V, VI)*, <i>M. gastri</i>
7	MXE	<i>M. xenopi</i>
8	MGO	<i>M. gordonae</i>
9	MGV	<i>M. genavense</i>
10	MSI	<i>M. simiae</i>
11	MMU	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
12	MCE	<i>M. celatum</i>
13	MAIS	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , MAC, <i>M. malmoense</i>
14	MAV	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. silvaticum</i>
15	MIN-1	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Min-A, -B, -C, and-D)
16	MIN-2	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Mac-A)
17	MSC	<i>M. scrofulaceum</i>
18	MML	<i>M. malmoense</i>
19	MHP	<i>M. haemophilum</i>
20	MCH-1	<i>M. chelonae</i> complex (group I, II, III, IV, <i>M. abscessus</i>)*
21	MCH-2	<i>M. chelonae</i> complex (group III, <i>M. abscessus</i>)*
22	MCH-3	<i>M. chelonae</i> complex (group I)*
23	MFO	<i>M. fortuitum</i> - <i>M. peregrinum</i> complex
24	MSM	<i>M. smegmatis</i>

*group is based on sequevar derived from 16S-23S nucleotide sequences. sqv., sequevar

て、データベースが豊富な16S rRNA 遺伝子のシーケンスを、さらに16S rRNA 遺伝子の相同性解析で同定が困難な菌株に対してはITSシーケンス解析を追加し菌種を決定した。PCR反応は岩本らの方法¹⁴⁾に準じ、Takara Ex Taq (タカラバイオ)を用いて、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部AとBを含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3']と264R [5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3']を用いてPCR増幅産物を得た。ITS領域全長の増幅にはITS1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3']とITS2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3']を用いた。PCR産物を精製した後BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan)を用いて16S rRNA 遺伝子の部分配列とITS全長の塩基配列を得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOMを用いて相同性検索を行い、99%以上の塩基配列一致をもって同一菌種と決定した。

結 果

供試菌122株のうち112株においてINNO-LiPA法と3種類の同定キットの結果が一致した。対象菌株のうち結核菌群の7株はすべて、結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット、キャピリアTBとINNO-LiPA法の結果が一致した。NTM 115株のうちアキュプローブ

MAC法でMACと同定され、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により*M. avium*と同定された24株はINNO-LiPA法ではMAISとMAVプローブのバンドを認めた。一方アキュプローブMAC法でMAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により*M. intracellulare*と同定された7株がMAISとMIN-1プローブに反応していたが、菌株23のみMIN-1に反応を示さず結果に乖離が見られた。DDH法を実施した83株のうち再検査を実施しても同定不能となった株は6株認められた。これら6株のうち3株はINNO-LiPA法でもMYC genusにしか反応が見られなかった。一方DDH法で菌種同定ができたがINNO-LiPA法との間に結果の食い違いが見られた株は3株認められた。したがって3種類の同定キットのいずれかとINNO-LiPA法との間で同定不能や結果が異なった10株に対してシーケンス解析を行った。

6株(菌株2, 19, 14, 22, 7, 6)はシーケンス解析結果とINNO-LiPA法の結果が一致した。菌株2と19はINNO-LiPA法でMKA-3の反応を認め*M. kansasii* 3と判定され、シーケンス解析からそれぞれアキュプローブカンサシで陰性となる*M. kansasii* sqv. IIIとVIと判定された。菌株14はINNO-LiPA法、シーケンス解析ともに*M. gordonae*と判定された。一方、菌株5と23の2株は同定キットの結果とシーケンス解析結果が一致した。菌株5は、INNO-LiPA法でMYC genusに反応が認