

に、結核対策のあり方に関し、重要な項目に関し、国内の専門家集団による、各現場からの問題分析と具体的な提言がなされたこと、国際的な専門家が主導して、国際的視点による評価と提言がなされたことは、国による、結核に関する特定感染症「予防指針の改定」、都道府県による「活動計画」を行われるタイミングの中で、貴重な資料を提供することになったと考える。

低まん延下における結核対策を全国的に維持してゆくためには、臨床および公衆衛生（行政）の両分野における結核専門家からなる全国ネットワークの構築は結核対策の質を維持する上で有用であるばかりでなく、各地域の特性に応じた結核対策体制の構築にとっても有用である。こうしたネットワークをより持続的かつ準公的な組織とすることが望ましい。

DOTSの医学的治療効果のみでなく、社会的、心理的エンパワメントを引き起こし、生活づくりや社会づくりにも貢献しているという観察を、より検証すべく社会科学的に検証を試みた。社会的弱者や患者は対策の受益者という意味だけでなく、当事者参加という重要な側面があり、この点の持つ意義もさらに研究されるべきであろう。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

なし(準備中)

(2) 学会発表

1. 佐藤和央、河津里沙、石川信克、他：ホームレスに対する保健所DOTSのエンパワメント効果（その1）－服薬支援を超えて－ 第69回日本公衆衛生学会総会（2010）

2. 河津里沙、佐藤和央、石川信克、他：ホームレスに対する保健所DOTSのエンパワメント効果（その2）－研究の方法論的検討－ 第69回日本公衆衛生学会総会（2010）

H. 知的財産の出願・登録状況

特記事項なし

<研究協力者>

星野 齊之 前結核予防会結核研究所対策支援部企画・医学科長

河津 里沙 結核予防会結核研究所特別研究員

安江 鈴子 新宿ホームレス支援機構

佐藤 和央 新宿区保健所健康部 保健師

福内 恵子 新宿区保健所 所長

菌バンク機能の活用及び病原体サーベイランスの構築

研究分担者

御手洗 聡 （公財）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長

研究要旨

結核菌に関する病原体サーベイランスシステムを構築することを目的として、衛生検査所（検査センター）と地方衛生研究所のシステム構成上の可能性を検討し、併せてこれを集約する施設としての結核研究所結核菌検査・保管施設の有用性等を検討した。

2008～2010年度中に結核菌検査・保管施設にて結核菌の全国耐性サーベイ、国内外のレファレンス検査、国内外に対する薬剤感受性検査精度保証（外部精度評価）、集積された結核菌株を利用した細菌学的研究が実施され、サーベイランスシステム上の中心的役割を担うことが可能であると考えられた。一方、地方衛生研究所には結核菌の薬剤感受性検査や分子疫学解析などの実施が可能な施設があり、結核対策上必要な積極的疫学調査としての位置づけが明確であり、なおかつ適切な予算と人員が確保できれば病原体サーベイランスにおける地域レファレンス検査室として機能しうると考えられた。

検査センターは日常業務として結核菌の分離及び薬剤感受性検査を実施している。大規模な施設では日本全国から検体を受託しており、いくつかの施設の結果を集積して解析することで結核菌薬剤耐性全国調査に匹敵するデータを提供することが可能と思われた。ただし年齢や性別などの臨床情報が不十分であり、結核治療歴に関する情報は利用できないため、未治療・既治療耐性など詳細を解析するには十分でない。しかしながら、精度保証されたデータとして結核菌耐性の全体的動向を継続的にモニタリングするには有用と考えられた。

A. 研究目的

結核の低まん延化に伴う、都市化や社会的弱者への集中化等の疾病構造の変化に対応するため、従来の地域的対応を集約強化し、国家として結核菌の情報を迅速に管理し、対策に応用する必要がある。そのため、これまで地域毎に分散的に利用されていた結核菌情報を集約し、効果的病原体サーベイランスを実施する方法を検討する。

B. 研究方法

【結核研究所結核菌検査・保管施設の活用】

結核研究所にて2008年7月より運用を開始している結核菌検査・保管施設（菌バンク）について、この運用による有用性、効果的・効率的運用を検証する。

【病原体サーベイランスシステム】

結核菌病原体サーベイランスについて、民間検査機関からの検査データ収集・解析及び地方衛生研究所のネットワークの方向から有用性等を検討する。

〔検査センターにおける薬剤感受性検査データ〕

全国から結核菌検査を受託している民間衛生検査所（以降検査センター）を対象として、検査データの提供を依頼した。初年度は株式会社ミロクメディカルラボラトリー（ミロク）のみに全数検査を委託したが、統計処理上データ数が不足していることから、2009年度以降は三菱化学メディエンス株式会社（三菱化学）及び株式会社ビー・エム・エル（BML）における薬剤

感受性検査データを併せて収集した。また初年度にミロクより提供を受けた結核菌株の分子疫学解析上の有用性も検討することとした（結果は同班分担研究者の岡田全司博士の報告による）。なお、薬剤感受性データは基本的に Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM) 及び Ethambutol (EB) について収集することとするが、検査センターが使用する薬剤感受性キットによっては最初から二次抗結核薬が含まれており、そのため一部の検体については Ethionamide (ETH)、Kanamycin (KM)、Enviomycin (EVM)、Para-aminosalicylate (PAS)、Cycloserine (CS) 及び Levofloxacin (LVFX) のデータの解析も実施した。

〔地方衛生研究所のネットワーク〕

地方衛生研究所のネットワークを基盤にして、結核菌以外の病原体サーベイランスで培われた地域レファレンス機能の結核への応用について検討する。具体的にはモデル地域を設定（兵庫県立健康環境科学研究センター）し、薬剤感受性検査や遺伝子タイピングの実践性の検討を行う。

（倫理面への配慮）

結核菌サーベイランス研究に関しては、基本的に患者から分離された結核菌株のみを対象とする。また臨床情報については年齢、性別、分離地域のみを付随させ、個人を特定しうる情報との連結を不可能とする。個人情報との連結が不可欠な場合は、各研究機関での倫理委員会の承認を得た上で対象者に十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得ることとする。

C. 研究結果

【結核研究所結核菌検査・保管施設の活用】

結核研究所結核菌検査・保管施設の活用について、いくつかの分野での有用性が示された。

第一は、分担研究の第一目標でもある病原体サーベイに関するものであり、2007年から実施された第14回結核療法研究協議会薬剤耐性結核菌全国調査における中心的な役割を担った。具体的には全国の結核診療施設から3,647株の

抗酸菌を収集し、これらを安全に解析することを可能とした。特に三種病原体である多剤耐性結核菌を安全に所持管理する上で、同施設の果たした役割は大きい。また、ミロクメディカルラボラトリーにて分離された結核菌も保管しており、全国から分離された結核菌を使用した研究への応用が期待されている。

第二に、結核菌薬剤感受性検査の外部精度評価を実施する上で、適切なパネルテスト検体の準備と発送を可能とした。パネルテスト検体には精度上の安定性などが求められるが、同施設を使用することによって適切な環境で保存された標準株を安全に使用することが可能であった。

第三に、結核対策に重要と思われる様々な細菌学的研究を実施することが可能であった。前述の薬剤耐性サーベイやミロク分離株を用いることによって、日本国内での標準的 VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeat) 法の開発や日本国内での多剤耐性結核菌に対する二次抗結核薬や Rifabutin の効果の評価、日本国内での *M. bovis* 感染の頻度の解析、耐性結核の遺伝子検査法である Solid Phase Line Probe assay キットの精度評価などを実施している。これらの研究は抗酸菌レファレンス機能にも関連して有用である。

【病原体サーベイランスシステム】

〔検査センターにおける薬剤感受性検査データ〕

2008年度はミロクメディカルラボラトリーから INH、RFP、SM 及び EB の感受性検査について 907 件分のデータの供与を受けた。このとき全国を代表するにはデータ数が十分でなかったが、2002年に結核療法研究協議会（療研）が実施した全国薬剤耐性調査の結果と比較すると、INH、RFP、SM については有意な差はなかったが、EB について検査センターデータが有意に低かった ($p=0.008$)。また、MDR についても同様 ($p=0.046$) であった。

2009年度からは三菱化学メディエンスとビー・エム・エルからもデータの供与を受けることが可能となり 3,406 件分のデータが収集された。また 2010年度にはさらに件数が増加し、

10,815 件分のデータが集積された。しかしながら、同一の患者からの検体が複数回検査されていることがあることが考えられたため、これらの重複を年齢・性別・地域・実施時期等の情報から削除し、最終的には 2010 年度は 4,628 件(症例) 分のデータを解析することが可能であった。

2009 年度及び 2010 年度に得られたデータ数は全国的な耐性状況を評価する目的には十分であり、各年度の地域別結核罹患数によって補正した薬剤耐性率は、Any resistance が有意に低い結果となったが、各薬剤について有意差は認められなかった。2010 年度の多剤耐性結核菌の比率は 0.8%となり、これは第 14 回療研調査の結果とほぼ一致した。

2008 年にミロクメディカルラボラトリーから供与された結核菌株の中から地域別の結核罹患数(割合)に合わせて 200 株を抽出し、JATA-15 による VNTR 解析を実施した。最終的に 184 株の解析を実施しており、分子疫学サーベイランス上の有用性評価のため、政策医療ネットワークで同様に解析された菌株との整合性を評価する(岡田全司博士の分担にて報告の予定)。

[地方衛生研究所のネットワーク]

兵庫県立健康環境科学研究センターをパイロットとして、結核菌病原体サーベイランスにおける地方衛生研究所の機能について検討した。

病原体サーベイランスの構築上、いくつかの問題点が明らかとなった。まず患者数が多いため、現状では全県的な菌株の収集において、人員・予算上取り組めないこと、行政機関が積極的に取り組むための、病原体収集の根拠が希薄であることなどが問題となった。また病院の検体を受託検査しようとした場合の保険適用上の問題も挙げられた。さらに民間検査センターの遠隔化(県外で検査が行われている場合)による菌株の搬送問題等も実施上の問題となった。

実際に病原体サーベイランスを実施するにあたっては二つのアプローチが考えられた。感染症法第 15 条(積極的疫学調査)に依拠し、行政依頼型サーベイランスとして実施すれば、県庁・健康保健福祉事務所・医療機関・衛生研究所間の各機関の役割が明確であり、その連携で

実施することが可能であった。これに対して研究主導型サーベイランスでは、医療機関ごとに研究目的を説明し、了承を受ける必要があった。また、医療機関や医師が情報提供をする場合に、個人情報保護法に基づく個人情報利用制限の適用をうけた。さらに医療機関によっては薬剤感受性検査を民間の検査機関に外部委託しており、検査機関に対しても菌株の分与や輸送の申請を行い、了承される必要があった。また、どちらの方法でも一度多剤耐性結核菌と同定されると運搬上の手続きが煩雑となり、コストも増大するため、サーベイランス上の問題と考えられた。

実際に 2009 年度は健康福祉事務所において、接触者等から分離された 62 株、及び 2008 年度に結核菌病原体サーベイランスによって収集された 60 株の計 122 株を検査の対象にした。そのうち、結核菌が単離された 109 株について、薬剤感受性検査を実施した。また、2010 年度はそれぞれ 32 株と 114 株について検査を実施している。

衛生研究所の特性として、一般の検査センターよりも高度な検査が可能であり、対象とした結核菌について最小発育阻止濃度(MIC)の測定や耐性遺伝子の解析が可能であった。

D. 考察

結核菌に関する病原体サーベイランスシステムを構築することを主目的として、結核研究所結核菌検査・保管施設の活用を評価した。また検査センターで受託した結核菌検査の結果として蓄積されている薬剤感受性検査結果と菌株をサーベイランスに利用可能かどうか検討した。さらに日本で利用可能な公的微生物検査機関として、地方衛生研究所の結核菌サーベイランス機能についても検討を行った。

結核菌検査・保管施設では、感染症法の定める施設基準以上の安全性を確保した上で、結核菌薬剤耐性全国サーベイや国内外の結核菌レファレンス検査を実施しており、さらに多くの施設で廃棄される予定であった結核菌株を収集・保管しており、結果として Specimen Bank としての機能を充実させつつある。この Specimen Bank としての機能は、結核の診断法の開発や評

価に重要な役割を果たしており、サーベイランス上の機能とともに今後とも継続的に強化されるべきと考えられる。

検査センターが業務上収集した結核菌と付随する薬剤感受性に関するデータは、日本の代表的耐性結核菌調査として認識されている療研サーベイの結果とよく相関しており、薬剤耐性の継続的モニタリングの手段として有用であることが今回の研究で示された。検査センターに集積される結核菌株は主に結核検査室を持たない病院あるいはクリニックから依頼されたものであり、結核専門診療施設を含んだ場合に比較して耐性度が低いことが懸念されたが、十分な検体数を確保すれば全体としての *Any resistance* 以外に耐性率の差異は認められないことが示されており、5年に一回しか実施されない療研調査よりも迅速性の点で有用であると思われる。また、データ供与に寄与した検査センターは感受性検査外部精度評価を継続的に行っていることから、精度上の信頼性も高いと思われる。しかしながら、データに関して既治療・未治療の区別ができないこと、年齢・性別等の臨床データに欠損が多いことなどの問題点があり、実際にサーベイランスとして利用しようとする場合、データフォーマットを統一するなどの工夫や医療機関からの協力が不可欠と考えられた。

地方衛生研究所を主体として病原体サーベイランスを実施する場合のモデルとして、兵庫県立健康環境科学研究所にて研究を行った。衛生研究所が結核菌病原体サーベイランスを実施するには少なくとも行政指導型の調査として実施する必要があることが明らかであり、実際に実践可能であることが示されたと考える。日本においては *Public Health Laboratory* の考え方が希薄であるため、公衆衛生上重要な意味をもつ感染症の検査を公的機関で集中して実施するというシステムが存在しない。衛生研究所は今回示されたように微生物検査機関として *Public Health Laboratory* の機能を有しており、サーベイランス上の有用性は明確である。適切な規模で地域レファレンス検査室としての機能を付与すれば、他の病原体サーベイランス上の機能も強化されると思われる。現時点では、微生

物一般検査機関としては人員等の問題で膨大な検体を処理できないこと、施設基準等結核菌検査に対応できない施設もあること、行政指導型調査を主導する上での法的根拠が不明確であることなど問題点があるものの、これらの点が解決されれば結核菌病原体サーベイランスの中核的機関としての役割を果たすことが可能と考えられる。

E. 結論

結核菌病原体サーベイランスシステムを考える上で、精度保証や分離株の管理を行う中核施設と地域に於いてレファレンス検査室の役割を担う中間（地域）施設の存在は必須と考えられる。今回の研究から結核研究所結核菌検査・保管施設と衛生研究所がそれぞれの役割を担うことが示された。また、検査センターの日常業務から蓄積される薬剤耐性データや結核菌株もサーベイランスに有用であることが明確となった。それぞれに患者情報の精度や検体・菌株の収集法など解決すべき問題点も明確であるが、行政の積極的対応があれば解決可能であると考えられた。

F. 健康危機情報

多剤耐性菌を含む結核菌の取扱に関してバイオハザード上の危険があるが、GMTを基礎とした適切な実験・検査施設（BSL3）を用いて研究を実施しており、危険は最小限と考えられる。

G. 研究発表

（研究を通じて結核菌検査・保管施設に集積された結核菌株に関連した研究を列挙した。）

学会発表

1. 近松絹代, 水野和重, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広, 御手洗聡. *GenoType[®]MTBDRplus* 及び *GenoType[®]MTBDRsl* による薬剤感受性検査の検討. 第22回日本臨床微生物学会学術集会 岡山 2011年1月8日
2. H Yamada, S Mitarai, T Sugamoto, H Matsumoto, K Chikamatsu, K Mizuno, A Aono, A Fujiki. Improved polyacrylamide-based artificial sputum with cultured cell and

formalin-fixed TB bacilli. 40th World conference on IUATLD. Berlin, Germany 2010.

3. 御手洗聡, 狩長亮二, 山田博之, 羽田野智之, 水野和重, 近松絹代, 青野昭男, 菅本鉄広. TRICORE 集菌キットを用いた結核菌前処理法の検討. 第 22 回日本臨床微生物学会学術集会 岡山 2010 年 1 月 8 日
4. 御手洗聡. 結核菌薬剤感受性検査の精度保証. 第 22 回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 東京 2010 年 12 月 4 日
5. 村瀬良朗, 御手洗聡, 前田伸司, 大角晃弘: 結核菌遺伝系統別にみた感染伝播への影響 第 85 回日本結核病学会総会 京都 2010 年 5 月 21-22 日
6. 近松絹代, 水野和重, 山田博之, 青野昭男, 御手洗聡: GenoType[®]MTBDR Plus による多剤耐性結核菌同定に関する検討 第 85 回日本結核病学会総会 京都 2010 年 5 月 21-22 日
7. 山田博之, 近松絹代, 水野和重, 菅本鉄広, 藤木明子, 松本宏子, 御手洗聡: 培養細胞とフォルマリン固定した培養抗酸菌を用いた改良人工痰の特性と有用性 第 85 回日本結核病学会総会 京都 2010 年 5 月 21-22 日
8. 上山雅子, 近松絹代, 吉山崇, 尾形英雄, 工藤翔二, 御手洗聡. 臨床分離結核菌群における *M. bovis* の分離頻度. 第 84 回日本結核病学会総会 札幌 2009 年 7 月 2, 3 日.
9. 近松絹代, 水野和重, 角 泰人, 山田博之, 御手洗聡. 多剤耐性結核菌に対する Rifabutin の薬剤感受性. 第 84 回日本結核病学会総会 札幌 2009 年 7 月 2, 3 日
10. 御手洗聡, 近松絹代, 水野和重, 山田博之. GenoType MTBDR plus Solid Phase Line Probe Assay の基礎的評価. 第 156 回結核病学会関東支部会 つくば 2009 年 9 月 5 日.
- virulent *Mycobacterium tuberculosis* with visualization of the outer membrane and satisfying biosafety requirements. J Microbiol Methods. 2010; 80: 14-18.
2. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T. Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 1164-1168.
3. Murase Y, Maeda S, Yamada H, Ohkado A, Chikamatsu K, Mizuno K, Kato S, Mitarai S. Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, Japan. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 948-954.
4. Maeda S, Wada T, Iwamoto T, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features. Int J Tuberc Lung Dis. 2010; 14: 1201-1204.
5. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Evaluation of a line probe assay for the rapid detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2011; 60: 184-188.
6. 近松絹代, 水野和重, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広, 西山裕之, 御手洗聡. GenoType[®] MTBDRplus による多剤耐性結核菌同定に関する検討 結核 (in press)
7. Philippine Nationwide Tuberculosis Drug Resistance Survey Team. Nationwide drug resistance survey of tuberculosis in the Philippines. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13: 500-507.
8. 近松絹代, 水野和重, 山田博之, 御手洗聡. 多剤耐性結核菌における Rifampicin と Rifabutin の交差耐性の検討. 結核 2009 ; 84 : 631-633.
9. 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

論文発表

1. Yamada H, Mitarai S, Chikamatsu K, Mizuno K, Yamaguchi M. Novel freeze-substitution electron microscopy provides new aspects of

ム -JATA (12)-VNTR 分析法の実際- 結核. 2008; 83: 673-678.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究協力者：

- 近松絹代、水野和重、山田博之、青野昭男（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）
- 辻 英高、齋藤悦子、近平雅嗣（兵庫県立健康環境科学研究センター感染症部）
- 玉井清子、柳沢英二（株式会社ミロクメディカルラボラトリー）
- 霜島正浩（株式会社ビー・エム・エル）
- 渋谷俊介（三菱化学メディエンス株式会社）

医療機関からの病原体サーベイランス 及び
薬剤感受性結核の分子遺伝学的解析に関する研究

研究分担者

坂谷 光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長

岡田 全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究要旨

1. 結核入院治療において日本の40%以上の結核患者を診療している国立病院機構呼吸器疾患研究ネットワーク施設と大阪府立呼吸器アレルギー医療センターの薬剤感受性結核菌の遺伝子タイピングを行った。
2. 当院に集めた1262株（近畿中央、大阪府立呼吸器、愛媛、山口、東京）に対して、Supply等の15 Optimized MIRU-VNTRを行った。
 - ① 396名がクラスターを形成して、クラスター形成率は31.4%であった。
 - ② 35名からなるクラスターは1組、20名からなるクラスターは2組、19名からなるクラスターは1組、等であった。
おのおのの居住地等の接点はなかった。
この結果より、共通の菌株が東京、大阪間を含む広域地域に分布していることが明らかになった。これらの菌の感染力が強いのか、公衆衛生的な要因で菌が感染しているのかは不明であるが今後の更なる検討が望まれる。
3. これらの791株に対して、JATA12のVNTRを行った。
 - ① クラスター形成率は31.2%であった。
 - ② 24名からなるクラスターは1組、14名からなるクラスターは1組、等であった。
Supplyの15VNTRでクラスター形成した結核菌はJATA12VNTRでもクラスター形成が強いことが示された。
4. クラスター形成の結核菌感染症と結核病変（臨床像）及び合併症。
結核空洞の率が高いクラスターは、それぞれ35人、20人、19人、14人からなるクラスターで認められ、結核空洞は81.8%と高率であった。糖尿病合併は20人からなるクラスターに60%の頻度で認められた。

結核菌送付について、呼吸器疾患研究ネットワークグループにアンケート調査を行った。薬剤感受性結核菌の移送に協力的で、感受性検査は自施設で今後も行う施設が多いことが判明した。

A. 研究目的

1. 病原体サーベイランスについて医療機関のネットワーク（国立病院機構呼吸器ネットワーク等）を活用した有用性の検討
2. 全国の国立病院機構施設及び結核病床を有する公立病院等の薬剤感受性結核菌の分子遺伝学的解析の研究。

JATAの12VNTRを行った。

3. 国立病院機構呼吸器研究ネットワーク65施設に、薬剤感受性を自施設で行っているか、送付可能か、等のアンケートを行った。

（倫理面への配慮）

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターでは臨床試験審査委員会に申請書を提出し、承認を得た。

B. 研究方法

1. 近畿中央胸部疾患センター429株、大阪府立呼吸器アレルギー医療センター858株、東京病院402株、山口宇部医療センター21株、愛媛病院74株、福岡東医療センター160株、合計1939株の薬剤感受性結核菌をすでに当院に集めた。
2. Supply等の15 optimized MIRU -VNTRと

C. 研究結果

1. 国立病院機構呼吸器研究ネットワーク65施設（図1）を束ねている当近畿中央胸部疾患センターに薬剤感受性結核菌株を送付してもらい、集積した。
2. 大阪府立呼吸器アレルギーセンターと共

同で結核菌遺伝子タイピングを行った。

3. (1)これらの菌株のうち 1262 株 (近畿中央 250 株、大阪府立呼吸器 458 株、愛媛 39 株、山口 21 株、福岡東医療センター100 株、東京 94 株) に対して、supply 等の 15 Optimized MIRU-VNTR を行った。

396 名 (総数 1251 名中) がクラスターを形成しており、クラスター形成率は 31.6%であった。35 名からなるクラスターは 1 組、20 名からなるクラスターは 2 組、19 名からなるクラスターは 1 組、14 名からなるクラスターは 1 組、10 名からなるクラスターは 2 組、等であった。(図 2、図 3、図 4)

(2)さらに、JATA の 12VNTR を行った。Supply の 15VNTR でクラスター形成した結核菌は JATA12VNTR でもクラスター形成が強いことが示された。(図 5)

(3)この結果より、共通の菌株が東京、大阪、

愛媛、山口を含む広域地域に分布していることが明らかになった。これらの菌の感染力が強いのか、公衆衛生的な要因で菌が感染しているのかは不明であるが今後の更なる検討が望まれる。

4. 結核空洞の率が高いクラスターは
 35 名からなるクラスター
 20 名からなるクラスター(a)
 19 名からなるクラスター
 14 名からなるクラスター
 であることが示された。(図 6、図 7)
5. 結核菌送付について、呼吸器疾患研究ネットワークグループにアンケート調査を行った。薬剤感受性結核菌を他の国立病院機構施設に送付 (共同研究として) は 93%可の答えを得た。自分の施設で薬剤感受性検査実施 86%であった。(図 8)

図 1

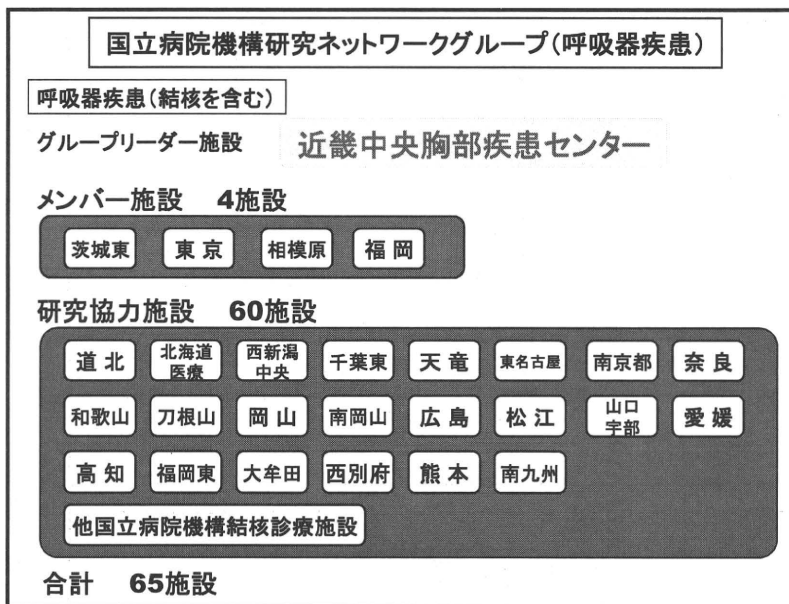


図 2

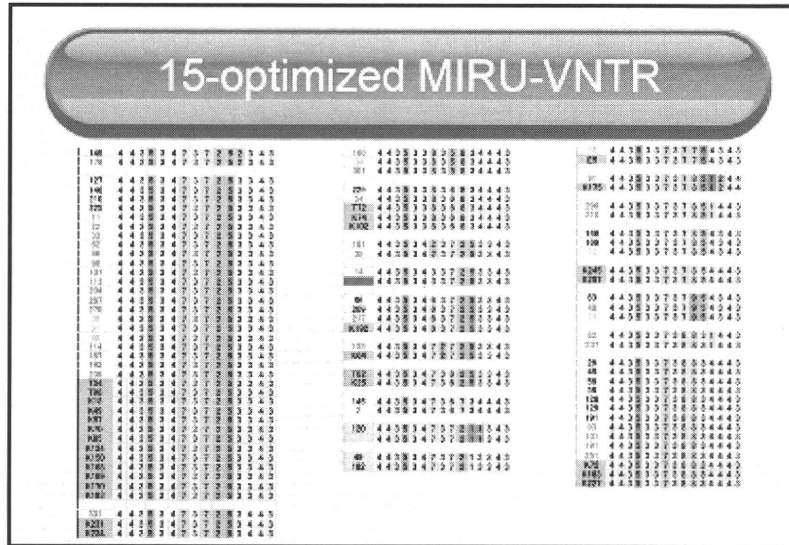


図 3

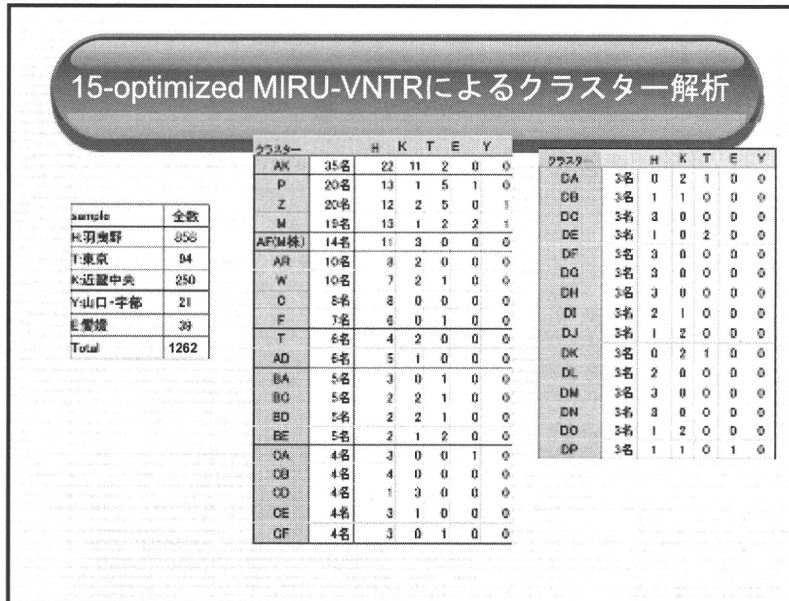


図 4

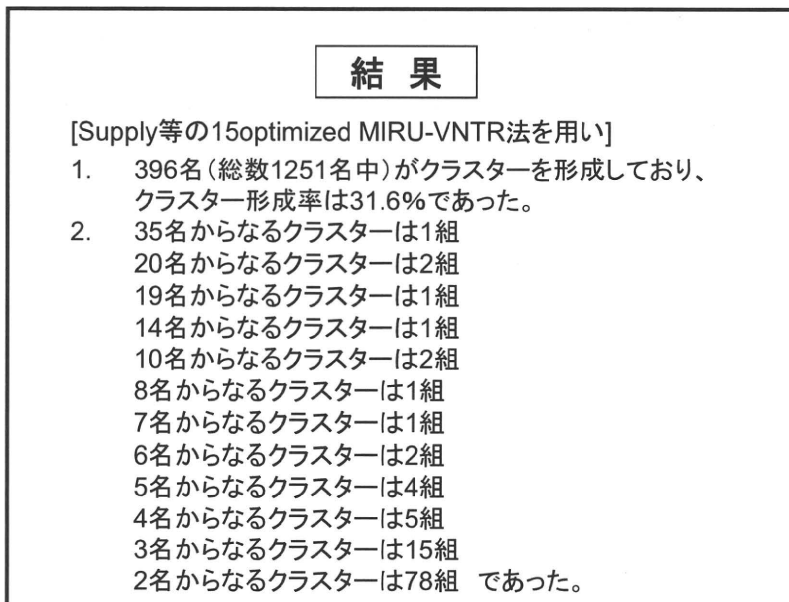


図 5

結 果	
[JATA12 VNTR法を用い]	
1.	247名(総数791名中)がクラスターを形成しており、クラスター形成率は31.2%であった。
2.	24名からなるクラスターは1組 14名からなるクラスターは1組 9名からなるクラスターは1組 8名からなるクラスターは2組 7名からなるクラスターは2組 6名からなるクラスターは4組 4名からなるクラスターは7組 3名からなるクラスターは12組 2名からなるクラスターは49組 であった。

図 6

結核空洞の率が高いクラスター		
	近畿中央胸部疾患 センター	東京病院
35人からなるクラスター	9/11 (81.8%)	2/2 (100%)
20人からなるクラスター(a)	4/5 (80%)	1/5 (20%)
19人からなるクラスター	1/1 (100%)	2/2 (100%)
14人からなるクラスター	3/3 (100%)	

図 7

結核空洞の率が高いクラスターの結核菌 VNTRパターン																
	クラスター 名	E-A	E-C	M-4	E-E	MI10	MI16	MI26	MI40	Q11	Q26	Q4156	M4	M21	M30	M39
35人からなる クラスター	AK	4	4	3	5	3	4	7	3	7	2	5	3	3	4	3
20人からなる クラスター(a)	P	4	4	3	5	1	3	7	3	7	8	5	4	3	4	3
19人からなる クラスター	M	4	4	3	5	1	3	7	3	6	8	5	4	3	4	3
14人からなる クラスター	AF (M株)	4	4	3	5	3	3	7	3	8	8	3	4	4	4	3

図 8

「結核菌送付についてのアンケート調査」 33施設に送り28施設より回答		
どちらかに○を付けて下さい		
I. 薬剤感受性結核菌を		
(1) 他の国立病院機構の施設に送付(共同研究のため)	可 26 (93%)	不可 2
(2) 自分の施設及び臨床検査科で薬剤感受性を検査しているか否か	はい 24 (86%)	いいえ 4
(3) 自分の施設で検査(RFLPやVNTR等の遺伝子解析)をしているか否か	はい 3 (11%)	いいえ 25
(4) 検査会社等に薬剤感受性検査のために送付しているか否か	はい 7 (25%)	いいえ 21
(5) 検査会社等に検査(RFLPやVNTR等の遺伝子解析)のために送付しているか否か	はい 8 (29%)	いいえ 20
(6) その他	その他の内容を簡単に:	

D. 考察

1. 医療機関のネットワーク（国立病院機構呼吸器ネットワーク等）を活用した病原体サーベイランスは有用であった。
2. VNTR により、全国にクラスターを形成する共通の結核菌の存在を明らかにし、空洞形成に関わる性質を持つ結核菌のクラスターを明らかにした。

E. 結論

1. 平成 20 年度～22 年度にわたる薬剤感受性結核菌の分子疫学解析（VNTR）の結果、共通の結核菌が東京、大阪、愛媛、山口を含む広域地域に分布している事が明らかになった。
2. 結核空洞の率が高いクラスターは
35 人からなるクラスター
20 人からなるクラスター(a)
19 人からなるクラスター
であることが示された。
3. Supply の 15VNTR でクラスター形成した結核菌は JATA12VNTR でもクラスター形成が強いことが示された。二つの相関性等については現在解析中である。
4. 結核菌送付について、呼吸器疾患研究ネットワークグループにアンケート調査を行った。薬剤感受性結核菌の移送に協力的で、感受性検査は自施設で今後も行う施設が多い

ことが判明した。

F. 健康危機情報
特に無し

G. 研究発表

- (1) 論文発表
 1. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the Inno-Lipa Mycobacteria v2 for Mycobacterial identification, Kekkaku 2009; 84: 15-21
 2. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the discrepant Mycobacterium tuberculosis strains between any ordinary susceptibility testing and rpoB gene analysis by the line probe assay. Kekkaku. 2008;83:577-583.
- (2) 学会発表
 1. 松本智成, 阿野裕美, 露口一成, 鈴木克洋, 岡田全司, 阿部聖裕, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅, 坂谷光則.: 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 実験結核. 80;29-30,2010
 2. 松本智成, 阿野裕美, 岡田全司, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 阿部聖裕, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅, 坂谷光則.: 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受

性結核菌のVNTR解析. 結核.2010;85(4):410

3. 松本智成、阿野裕美、露口一成、鈴木克洋、岡田全司、阿部聖裕、西村一孝、田尾義昭、村上一生、豊田恵美子、中島由槻、四元秀毅、坂谷光則. 大阪・東京・宇部・愛媛における薬剤感受性結核菌の分子疫学解析。実験結核2009; 79, 24-26

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願中)
2. 実用新案登録
3. その他

研究協力者：

- 坂谷光則 (NHO 近畿中央胸部疾患センター 前院長)
- 豊田恵美子 (NHO 東京病院 呼吸器科医長)
松本智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部長)
- 田尾義昭 (NHO 福岡東医療センター 医長)
- 西村一孝 (NHO 愛媛病院 院長)
- 阿部聖裕 (NHO 愛媛病院 統括診療部長兼呼吸器科医長)
- 村上一生、神徳済 (NHO 山口宇部医療センター 内科医師)
- 露口一成 (NHO 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 部長)
- 鈴木克洋 (NHO 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 統括診療部)

病原体サーベイランスについて医療機関のネットワーク
(国立病院機構呼吸器ネットワーク等)を活用した有用性の検討

研究要旨

国立病院機構の一施設として病原体サーベイランスについてどのように参加できるかについて試行、検討した。

A. 研究目的

感染症法下では、とくに多剤耐性結核菌は施設を超えての取り扱いが困難であること、細菌検査技師のマンパワーには限度があり菌株の収集や送付は決して容易ではない。しかし低蔓延に向かっている日本の結核対策を進める上で菌情報は重要であり、個々の施設のみ情報ではもはや結果を得ることができない。多施設共同研究では、研究検体を収集するか、各施設の結果のみを収集するかが問題である。ネットワーク研究に参加する一医療施設として研究検体の提出の手段の検討および当施設の検査結果の信頼性の検討をおこなった。

B. 研究方法

① 2009年より当研究班(全国の結核菌のVNTR解析)の研究について、菌株の提供要請を受けて、当施設での収集送付方法を検討した。検査技師のマンパワーを考慮し、出来るだけ労力を少なく、無作為に出来るだけ多くの検体を送付する目的で、現場の技師を中心にその方法を検討し実施した。

② 検体そのものでなく、検査結果を収集する場合には、参加施設の検査の精度と結果の信頼性が問題となる。自施設の検査結果の信頼性を把握するため、日常での薬剤感受性結果をMGIT法およびウエルバック法の結果の比較において検討した。

2008～9年に当院に活動性結核にて新規に入院治療した746例中、何らかの検体で培養陽性であった730例についてその薬剤感受性結果を検討した。ただし当院の診療システムでは、当初にMGIT法による5薬剤感受性(SM,INH,RFPEB,PZA)検査でいずれかが耐性である場合のみ、固形培地(ウエルバック法)で二次薬を含む感受性検査を実施している(結核診療ガイドラインP.48参照)。

C. 研究結果

① 当院では年間370人以上の菌陽性結核患者の入院があり、ルーチン検査として塗抹、培養、薬剤感受性検査を実施している。培養はMGIT法および初回は小川培地を併用して行われる。2009年当研究班松本氏より菌株提供の要請をうけるも、小川培地(菌株保存用)から分与のマンパワーの余裕がなく、松本氏の了解を得て以下の方法を編み出した。MGIT法で陽性となったチューブは一定期間と保存し、オートクレーブにかけて処分する。これを利用し、各患者の入院初期の陽性チューブよりサンプルチューブに保存して安全ボックスに詰めて、2009年100検体、2010年300検体を送付した。

② 2008～2009年に当院新規入院した菌陽性結核746例についてその薬剤感受性結果を検討した。当院ではMGIT法で5剤のうちいずれかが耐性で合った場合のみウエルバック法で11剤検査を実施することになっている。菌陽性結核746例中、MGITから増菌ができず固形培地での検査ができなかった13例、NTM混在のため結果が得られなかった3例を除いて730例の最終薬剤感受性結果は、5剤(HRESZ)感受性618例、何らかの耐性を示したものは112例であった。多剤耐性結核は6例で、初回耐性5例、獲得耐性1例であった。今回の検討対象はMGIT法で何らかの耐性を示した112例で、ウエルバック法と結果が一致したもの71例、不一致であったもの41例であった。PZAについては標準の方法がないPZAのみの不一致14例を除いても一致率は72.4%となり、良好とはいえない結果であった。

D. 考察

結核患者数が減少している現状で、一施設のみでは研究が困難である。とくに疫学的研究では広く多施設からの症例や検体の収集が必要である。結核菌株の収集は、感染症法下での多剤耐性菌株の輸送の困難さ以外でも決して容易ではない。自施設では研究に参加協力の意思があっても、マンパワーの問題で検体の収集送付は困難である。

一つの解決策として、現場の検査技師の提案で、廃棄前の MGIT 陽性のチューブを送付することを検討した。一部をサンプルチューブに移せば多数を一度に送付可能とのことで、試行した。しかし操作による感染の危険性を考慮すると、MGIT のチューブのまま送った方が安全かと思われた。また廃棄前に患者 ID を提出日をチェックしておくのに手間取ったので、計画的にその都度ピックアップしておけばよいと思われた。

他の参加の方法として、自施設の検査結果を提出する方法があるが、各施設の精度管理と信頼性が問題である。当施設は毎年行われる結核研究所の精度管理テストには合格しているので、標準レベルはクリアしている。しかし今回の MGIT 法でなんらか耐性株をウエルパック法の結果と比較すると 73%で低い。過去の報告では MGIT 法の固形培地の結果との一致率は 97%とされている。この結果は殆どが全薬剤感受性菌で、母集団が異なるためのディスクレパンシーと考えるが、某専門家から RFP の不一致率が高いことを指摘されており、十分な精度といえるかは疑問が残った。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析

研究要旨

国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌株にて分子疫学タイプング行ない昨年引き続き全国規模の結核分子疫学解析を行った。検体採取地域の集団感染並びに、広域な結核感染の分布を評価した。大阪（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、近畿中央胸部疾患センター）、東京（東京病院）、愛媛（愛媛医療センター）、宇部（山陽病院）、福岡（福岡東病院）から得られた菌株 1251 株に対して、Supply 等が提唱した 15-optimized MIRU-VNTR を行った。また、同菌株 1108 株に対して日本で提唱された JATA12 を行った。15-optimized MIRU-VNTR 解析においては 396 名(総数 1251 名中)がクラスターを形成しておりクラスター形成率は、31.6%であった。JATA12 による解析では 247 名(当院のみ 791 名中)がクラスターを形成しておりクラスター形成率は 31.2%であった。少なくとも東京、大阪間を含む広域地域において同一の結核菌の感染拡大が認められた。また、これらの菌において、空洞形成能が一般に比べ高い可能性が示唆された。国立病院機構呼吸器ネットワークを利用した薬剤感受性菌株について解析を進めるで日本国内の結核菌の分子疫学的特長を見出すとともに外来性結核菌進入を早期に検出することに有用である。そのためには、北海道、東北、関東甲信越、中部、越後、近畿、四国、山陽、九州、沖縄からサンプル収集をおこない解析を行う事が望ましい。

A. 研究の目的

日本において結核は減少しているが、世界的に見ると再び増加してきていて日本でも再び増加する可能性がある。なぜなら、合衆国において 1980 年代なからばから 1990 年代初頭にみられた下記の結核の再流行時の状況と現在の日本の状況が似ているからである。

1. 結核コントロールの主要機関への投資の減少。
2. HIV/AIDS の流行
3. 結核蔓延地から合衆国への移民の増加
4. ホームレスシェルターや老人ホーム等での集団感染
5. 多剤耐性結核の出現

さらに昨年より不況がまして、満足に医療にかかれない国民が増え、結核の罹患率も今年は昨年に比べ減少率が低下し、しかも死者数においては前年度を上回るようになった。結核が再上昇する社会的素地はできている。したがって、上記不安材料に対して結核の蔓延を防ぐために、分子疫学解析を行い結核の感染経路を解明し、その結果に基づき効率のよい結核感染対策を行う土台を作成する事を目的とする。

B. 研究方法

上記目的を遂行するために国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌株にて分子疫学タイプング行ない全国規模の結核分子疫学解析を行った。検体採取地域の集団感染並びに、広域な結核感染の分布を評価した。

大阪（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、近畿中央胸部疾患センター）、東京（東京病院）、愛媛（愛媛医療センター）、宇部（山陽病院）、福岡（福岡東病院）から得られた菌株 1251 株に対して、Supply 等が提唱した 15-optimized MIRU-VNTR を行った。また、同菌株 1108 株に対して日本で提唱された JATA12 を行った。

C. 研究結果

15-optimized MIRU-VNTR 解析にて、396 名(総数 1251 名中)がクラスターを形成しておりクラスター形成率は、31.6%であった。JATA12 による解析では 247 名(当院のみ 791 名中)がクラスターを形成しておりクラスター形成率は 31.2%であり、ほぼ等しかった。

2 名からなるクラスターは 78 組、3 名からなるクラスターは 15 組、4 名からなるクラスターは 5 組、5 名からなるクラスターは 4 組、6 名からなるクラスターは 2 組、7 名からなるクラスターは 1 組、8 名からなるクラスターは 1 組、10 名からなるクラスターは 2 組、14 名からなるクラスターは 1 組、

19名からなるクラスターは1組、20名からなるクラスターは2組、35名からなるクラスターは1組であった。また10名以上からなるクラスター形成する患者において、クラスターを形成しない患者に比べて、より空洞形成を有する傾向にあった。おのおのの居住地等の接点はなかった。

D. 考察

我々の結果より、少なくとも東京、大阪間を含む広域地域において同一の結核菌の感染拡大が認められた。これらの菌において、空洞形成能が一般に比べ高い可能性が示唆された。今後の更なる検討が望まれる。解析をすすめ経年的な特徴を得るとともに、国立病院機構呼吸器ネットワークを利用した薬剤感受性菌株について解析を進めることにより日本国内の結核菌の分子疫学的特長を見出すとともに外来性結核菌進入を早期に検出するための基礎作りを行う。そのためには、北海道、東北、関東甲信越、中部、越後、近畿、四国、山陽、九州、沖縄からサンプル収集をおこない解析を行う事が望ましい。

E. 結論

結核の蔓延を防ぐためには、分子疫学解析を行い結核の感染経路を解明し、その結果に基づき効率のよい結核感染対策を行わなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Edgar Abadia, Jian Zhanga, Tiago dos Vultos, Viviana Ritacco, Kristin Kremer, Elif Aktas, Tomoshige Matsumoto, Guislaine Refregier, Dick van Soolingen, Brigitte Gicquel and Christophe Sola, Resolving lineage assignation on Mycobacterium tuberculosis clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method, *Infection, Genetics and Evolution*, 2010; 10(7): 1066-1074
2. Yamaguchi M, Bessho Y, Inoue T, Asai Y, Matsumoto T, Murase K Investigation of optimal viewing size for detecting nodular ground-glass opacity on high-resolution computed tomography with cine-mode display, *Radiol Phys Technol* 2010

2. 学会発表

1. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 松本智成. 大都市結核対策研究会, 2010年3月 大阪
2. Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular Epidemiology of Tuberculosis. 松本智成. 第83回日本細菌学会総会ワークショップ W6 新興・再興感染症の疫学情報からみた課題と問題点 2010年3月 東京
3. 生物製剤使用の為の結核対策. 松本智成. リウマチ医の為の肺障害研究会 2010年3月 東京
4. Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular Epidemiology of Tuberculosis. 松本智成. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 東京
5. 「感染症とサイトカイン」. 松本智成. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
6. 自動細菌タイピング装置、Diversilabによる結核菌株の解析. 松本智成. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
7. 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗TNF製剤投与の安全性と有効性. 松本智成. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 兵庫
8. Safety of Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Eight Patients with Tuberculosis. 松本智成. 第50回日本呼吸器学会総会 2010年4月 京都
9. トルコの結核菌株および大阪結核菌株間の DNA 代謝遺伝子相同性の新規 SNPs での解析 -3-VNTR 解析による T3-Osaka 株と 2007 年に大阪と東京で得られた結核菌株間の比較 財団法人大阪結核研究会奨学研究費対象研究. 松本智成. 大阪結核研究会 2010年5月 大阪
10. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 松本智成, 阿野裕美, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 坂谷光則, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅. 第80回実験結核研究会 2010年5月 京都
11. 細菌学4 (結核菌・抗酸菌・真菌等). 松本智成. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
12. 当センターで得られた Mycobacterium tuberculosis 株における rifampin と rifabutin の minimum inhibitory concentration の検討. 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 第85回日本結核病学会

2010年5月 京都

13. 当センターで得られた *Mycobacterium avium* 株および *Mycobacterium intracellulare* 株における rifampin と rifabutin の minimum inhibitory concentration の検討：結核菌株と比較してアビウムの加療時の rifampin の MIC による感受性試験結果は現実とあっていない可能性が高い。松本智成,阿野裕美,田村嘉孝,永井崇之. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
14. 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗TNF製剤投与. 松本智成,阿野裕美,田村嘉孝,永井崇之. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
15. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 松本智成,阿野裕美,鈴木克洋,露口一成,喜多洋子,金丸典子,坂谷光則,西村一孝,田尾義昭,村上一生,豊田恵美子,中島由槻,四元秀毅. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
16. 生物学的製剤使用時における結核のスクリーニング、予防内服、治療について. 松本智成.日本内科学会東北地方会 第56回生涯教育後援会 2010年6月 仙台
17. Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Patients with Tuberculosis. Tomoshige Matsumoto. 45nd US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy 13 July, 2010, Broad Institute, Boston, MA
18. 多剤耐性結核の分子疫学解析とゲノム解析の今後展望. 松本智成. 第63回日本細菌学会九州支部総会 2010年9月 宮崎

G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

該当なし

薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討

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

要旨:〔目的〕薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて分離され, 薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, 臨床的に同薬剤に対する治療効果が乏しい肺結核症患者由来の 6 株と, 判定結果が薬剤感受性検査間で一致しない 9 株の合計 15 株。〔方法〕3 種類の薬剤感受性検査を実施し, 遺伝子診断としてジェノスカラー・Rif TB を使用した。同時にシーケンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域部位の特定を行った。〔結果〕薬剤感受性検査の結果, 15 株すべてはいずれかの方法で RFP 感受性もしくは判定保留を示した。ブロスミック MTB-1 法を用いた最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。一方ジェノスカラー・Rif TB においてすべての株は変異型を示し, シーケンス解析でも *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認され RFP 耐性と判定された。〔結論〕今回われわれは通常の薬剤感受性検査で耐性と判定されない低レベルの RFP 耐性結核菌に対して薬剤耐性遺伝子検査を行うことにより正しい感受性結果を得ることができた。

キーワード: 結核菌, 薬剤感受性検査, 薬剤耐性遺伝子, *rpoB*, MIC

はじめに

多剤耐性結核菌 (MDR-TB) の出現と蔓延を防止するためには, 有効な薬剤の選択を可能とする迅速かつ正確な結核菌の薬剤感受性検査の実施が欠かせない。一次抗結核薬剤の 1 つであるリファンピシン (RFP) の迅速な感受性判定は多剤併用療法を施行していくうえで非常に重要であるが, 正確な感受性判定には一定の熟練が必要である。また結核菌の発育速度が遅いため判定までに時間がかかるという問題点もある。一方, 近年結核菌の薬剤耐性に関連する遺伝子の解明が進んでおり, 遺伝子変異の有無を検出することによって迅速な薬剤感受性判定を可能とする各種キットが開発されている^{1)~3)}。今回われわれ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において RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例を経験した。そこで, これらの症例由来の臨床分離菌株に対して

最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, line probe assay を応用した RFP 耐性結核菌検出キット⁴⁾を用いて *rpoB* 遺伝子中の変異の検出を行った。さらにシーケンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域の特定を行い, 薬剤感受性判定の正確性を検討した。また比率法で判定される薬剤感受性検査では判定結果が菌の発育状況に左右されやすく, とくに長期治療中の肺結核症患者からの分離菌株で不安定な場合があることから⁵⁾, RFP 感受性結果が複数回の薬剤感受性検査ごとに異なる症例についても同様の方法で RFP 感受性判定を試みた。

対象と方法

〔対象〕

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例由来の臨床分離菌 6 株をグループ 1 とした。グループ 1 の

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

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 4 Feb. 2008 / Accepted 28 Apr. 2008)

うち5症例は初回治療例であったが、1症例 (No. 6) については前回治療歴があり、その際実施した薬剤感受性検査結果はRFP感受性と判定されていたが、10カ月後、再排菌を起こし再入院するに至った。しかし再治療時におけるRFPの臨床的効果が芳しくなかったため、この症例におけるRFPに対する感受性の変化を検討するために前回入院時の菌株6^sについても同様に調べた。

RFP感受性結果が薬剤感受性検査ごとに異なるもしくは発育不良で判定不能となった臨床分離結核菌9株 (3症例) はグループ2として、同様にRFPに対する感受性検査を実施した。

耐性結核菌検出キットの精度評価として上記以外に、薬剤感受性検査結果と臨床的効果に相関が認められた肺結核症例由来菌15株 (RFP感受性7株、RFP耐性8株) とH37Rv株をコントロール対照として用いた。

〔方法〕

菌株の同定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) で行った。

薬剤感受性検査は液体培地を用いるBACTEC MGIT 960 AST結核菌薬剤感受性検査用MGITシリーズ (MGIT-AST法、日本ベクトン・ディッキンソン) と小川比率法に基づくウエルパック培地S (日本ビーシージーサプライ)、Middlebrook 7H9液体培地を用いた微量液体希釈法によるプロスミックMTB-1 (極東製薬工業) を用いた。RFPの耐性基準濃度はMGIT-AST法では1.0 µg/ml、ウエルパック培地S法では40 µg/ml、プロスミックMTB-1法では4.0 µg/mlとし、プロスミックMTB-1法のみ判定保留域として、0.06~2.0 µg/mlの基準を設け、0.03 µg/ml以下で感受性と判定した。MIC測定にはプロスミックMTB-1法を用いた。

RFP耐性結核菌検出として、line probe assayを用いた結核菌 *rpoB* 遺伝子の変異検出用試薬ジェノスカラー・Rif TB (ニプロ) を使用説明書に準拠して用いた。まず臨床分離菌株からインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) を用いてDNAを抽出、精製し、結核菌群 *rpoB* 遺伝子増幅試薬 (ニプロ) を使用して *rpoB* 遺伝子の polymerase chain reaction (PCR) 増幅を行った。得られたPCR増幅産物をLiPA検体として、ジェノスカラー・Rif TBにて *rpoB* 変異部位の検出を行った。

本試薬は発色確認用コントロール、結核菌群特異的プローブおよび9種類の *rpoB* 遺伝子プローブが固相化されたストリップに、増幅されたDNAをハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって結核菌の同定ならびに *rpoB* 遺伝子型の判定を行う。 *rpoB* 遺伝子プローブは19~23個の塩基からなる部分的に重複した5種類の野生型プローブ (S1~S5) と、RFP耐性結核菌に見られ

る *rpoB* 遺伝子変異のうち頻度の高い4種類の変異の変異型プローブ (R2, R4a, R4b, R5) から構成されている。プローブS1~S5は野生型の塩基配列に対応し、検体のDNA配列が野生型の場合5本の発色が見られ、RFP感受性と判定する。変異が存在する場合は相当するプローブに発色が見られず、RFP耐性と判定する。またD516V, H526Y, H526D, S531Lの変異が存在する場合はそれぞれのRプローブが対応し、発色する。

すべての菌株に対してPCRによる *rpoB* 遺伝子変異領域 (69 bp) のシーケンス解析を行った。同時に van Embdenら⁶⁾の方法に準拠してIS6110-RFLP法を施行し、菌株の異同を検討した。

結 果

薬剤感受性検査

供試菌15株の薬剤感受性検査の結果は3方法のうちいずれかの方法にて感受性もしくは判定保留と判定された。グループ1の6症例においては、MGIT-AST法とウエルパック培地S法で感受性と判定されたが、プロスミックMTB-1法では判定保留もしくは耐性と判定され、MIC値は0.25~4 µg/mlであった。また症例6の場合、再入院時において排菌された菌株6が判定保留を示していたが、前回治療時の保存菌株6^sは3方法すべてに感受性と判定され、MIC値は0.03 µg/mlであった (Table 1)。

グループ2の3症例 (1, 2, 3) におけるMIC値は0.25~4 µg/mlであった。そのうち症例1における菌株1のMIC値は0.25 µg/mlを示したが、17カ月後に分離された菌株2では4 µg/mlと上昇していた (Table 2)。

line probe assayならびにシーケンス解析

コントロール対照の15株とH37Rv株はジェノスカラー・Rif TBで薬剤感受性検査と同じ結果を示した。一方、グループ1および2における15菌株すべてはジェノスカラー・Rif TBで耐性と判定され、変異のパターンはS1欠損、S2欠損、S3欠損、S4欠損と多型性を認めた。そのうち薬剤感受性検査結果が不安定なグループ2の症例1, 2, 3においては菌株間でキットごとの判定結果は変わらなかった。グループ1の症例6における前回治療保存菌株6^sは野生型を示し、感受性と判定された。

シーケンス解析の結果、供試菌15株すべては *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認できた。そのうちRFP耐性株の8株はS5領域に変異の認められた株が4株、S3領域においては2株、S1とS4領域に各1株認められた。グループ1における症例1, 2, 3は3症例ともに共通してアミノ酸コドン526部位にヒスチジン (His) からセリン (Ser) への遺伝子変異を認めた。症例4は516部位にアスパラギン酸 (Asp) からチロシン (Tyr) へ、症例5は511部位にロイシン (Leu) からプロリン (Pro) へ、症